

JORGE GONZÁLEZ AGUILERA

**CARACTERIZAÇÃO DE SUBAMOSTRAS DE TOMATEIRO DO
BGH-UFV, QUANTO A RESISTÊNCIA A BEGOMOVÍRUS E
ANÁLISE DA POPULAÇÃO VIRAL EM CONDIÇÕES DE CAMPO**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação
em Genética e Melhoramento, para
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2011**

JORGE GONZÁLEZ AGUILERA

**CARACTERIZAÇÃO DE SUBAMOSTRAS DE TOMATEIRO DO
BGH-UFV, QUANTO A RESISTÊNCIA A BEGOMOVÍRUS E
ANÁLISE DA POPULAÇÃO VIRAL EM CONDIÇÕES DE CAMPO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de setembro de 2011

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Co-orientador)

Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior
(Co-orientador)

Prof. Poliane Alfenas-Zerbini

Prof. Norma Eliane Pereira

Prof. Derly José Henriques da Silva
(Orientador)

Aos meus pais, Gonzalo e Migdalia,
Ao meu filho Ângelo pelo carinho e apoio,
Aos meus irmãos, Chino, Yanelis, Tomasito,
Miguelito e Eloibis,
Aos meus Sobrinhos, Elbalidia, Rogelito e Yadelis,
Aos amigos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de realização do curso.

Ao FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudo e recursos financeiros para o trabalho de pesquisa.

Ao Centro de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da UFV (BIOAGRO), nomeando o Laboratório de Virologia Vegetal imprescindíveis na execução desde trabalho.

Ao Professor Derly José Henriques da Silva pelo incentivo, apoio, orientação e, sobretudo, pela amizade.

Aos Professores Francisco Murilo Zerbini e Everaldo Gonçalves de Barros pela motivação, ensinamentos, disponibilização de espaço físico e recursos materiais para o desenvolvimento da pesquisa.

A meu colega, amigo e irmão Antonio Wilson O Malta e família, pela sua amizade, orientação e apoio. A toda a família Nogueira pelo apoio e por me deixar formar parte dessa bela família.

Aos colegas Leonardo Dantonini, Carlos Nick, Ahmed e Roberto, pelo ensino, orientação e, sobretudo, pela amizade.

A Dora pelo carinho e apoio.

Aos membros da banca examinadora, professores, pelas críticas e contribuições para a melhoria do trabalho.

Aos meus amigos do Laboratorio de Virología Vegetal Molecular: Joaquin, Carol, Ana, André, Álvaro, Amanda, Antônio, César, Davi, Fernanda, Joyce, Sara, Larissa, Marcelo, Márcio, Marcos, Pedro, Poliane, Renan, Roberto, Sarah, Sheila, Sílvia, Alison, Cesar, Dani, Fabio, Gloria, Tathi e Lenin; há todos muito obrigado pela enorme amizade.

Aos meus colegas do Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA), em Santiago de Cuba, Cuba, em especial a: Dainelis, David, Chapmam, Rodolfo, Elizabeth, Yilan, Albys, Melbi e Emilio. Aos meus colegas do INCA em La Habana, em especial: Francisco, Martha, Mercedes, Yuniet e Marilyn pelo apoio, motivação e amizade.

Aos professores, pesquisadores, funcionários e estagiários que, mesmo sem terem sido nomeados, contribuíram para minha formação e realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

JORGE GONZÁLEZ AGUILERA, filho de Gonzalo González Silva e Migdalia Aguilera Ocampo, nasceu o 5 de Novembro de 1973 em Santiago de Cuba, Cuba.

No ano 1996 recebeu o Título de Engenheiro Agrônomo pelo Instituto Superior de Ciências Agronômicas de Bayamo (ISCA-B) hoje Universidad de Granma (UG), localizado na província Granma, Cuba. No período de 1996 até o ano 2004, trabalho no Centro Nacional de Eletromagnetismo Aplicado (CNEA) da Universidade de Oriente (UO), Santiago de Cuba; ocupando o cargo de Reserva Científica e depois de Professor e Pesquisador.

Em Agosto de 2005, foi admitido no Programa de Pós-Graduação do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, e em agosto de 2007 fez a defesa de tese do mestrado.

Em setembro de 2007, foi admitido no doutorado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em 28 de setembro de 2011.

ÍNDICE

Página

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	5

CAPITULO I. Identificação dos genes <i>Ty-2</i> e <i>Ty-3</i> que conferem resistência a <i>begomovírus</i> em tomateiro (<i>Solanum</i> spp. seção <i>Lycopersicum</i>)	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO	13
MATERIAL E MÉTODOS	14
<i>CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS</i>	14
<i>EXTRAÇÃO DO DNA</i>	15
<i>CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DOS PCRS</i>	15
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
AGRADECIMENTOS.....	17
REFERÊNCIAS.....	17

CAPÍTULO II. Resposta de subamostras de tomateiro à inoculação de <i>begomovírus</i> que ocorrem no Brasil em condições controladas e de campo.....	24
RESUMO	25
ABSTRACT	26
INTRODUÇÃO	27
MATERIAL E MÉTODOS	29
<i>CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS</i>	29
<i>AVALIAÇÕES EM AMBIENTE PROTEGIDO</i>	29
<i>AVALIAÇÕES EM CAMPO</i>	32
<i>CARACTERIZAÇÃO DOS SINTOMAS VISUAIS</i>	32
<i>EXTRAÇÃO DO DNA E CONFIRMAÇÃO DA INFECÇÃO VIRAL POR MEIO DE HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR</i>	33
<i>IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES VIRAIS PRESENTES NO CAMPO</i>	34
<i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	35
RESULTADOS	35
<i>RESPOSTAS OBTIDAS EM AMBIENTE PROTEGIDO</i>	35

RESPOSTAS OBTIDAS EM CAMPO	38
SELEÇÃO DE MATERIAIS PROMISSORES EM AMBAS AS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	42
DISCUSSÃO	42
AGRADECIMENTOS.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
CAPITULO III. Estrutura genética de uma população de <i>Tomato severe rugose virus</i> no sudeste do Brasil	54
RESUMO	55
ABSTRACT	56
INTRODUÇÃO	57
MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	59
AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DOS GENOMAS VIRAIS	59
COMPARAÇÕES DE SEQUÊNCIAS E ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	61
ESTRUTURA E DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA DA POPULAÇÃO DE <i>ToSRV</i>	62
ANÁLISE DOS MECANISMOS DE SELEÇÃO.....	64
ANÁLISE DA RECOMBINAÇÃO	64
RESULTADOS	64
DETECÇÃO VIRAL E CLONAGEM DOS GENOMAS VIRAIS	64
COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIAS E ANÁLISE FILOGENÉTICA	65
ESTRUTURA GENÉTICA E TESTES DE NEUTRALIDADE DA POPULAÇÃO DE <i>ToSRV</i>	65
ANÁLISES DE RECOMBINAÇÃO NA POPULAÇÃO	67
DISCUSSÃO	69
AGRADECIMENTOS.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

RESUMO

GONZÁLEZ AGUILERA, Jorge, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2011. **Caracterização de subamostras de tomateiro do BGH-UFV, quanto a resistência a begomovirus e análise da população viral em condições de campo.** Orientador: Derly José Henriques da Silva. Co-orientadores: Everaldo Gonçalves de Barros e Francisco Murilo Zerbini Júnior.

As begomoviroses transmitidas pela mosca-branca (*Bemisia tabaci*) estão entre as principais causas de perdas na cultura do tomateiro no Brasil. Para evitar os danos e perdas na cultura do tomateiro, tem sido empregados cultivares e híbridos resistentes, em sua maioria, portadoras apenas do gene *Ty-1* que oferece tolerância aos begomovirus presentes no país. No mundo os genes *Ty-1*, *Ty-2* e *Ty-3*, e recentemente o alelo *Ty3a*, e os genes *Ty4* e *Ty5* são os que estão sendo empregados nos programas de melhoramento da cultura. Noventa e quatro subamostras de tomateiro pertencentes ao Banco de Germoplasma de Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa (BGH-UFV) foram avaliados em ambiente protegido e no campo quanto à resistência a begomovirus bissegmentados presentes no Brasil, inoculados via bombardeamento e infecção natural, respectivamente. Avaliações visuais dos sintomas (AVS) e confirmação da infecção viral (CIV) por meio de hibridização não radioativa foram realizadas aos 15, 30 e 45 dias após inoculação (DAI) em condições de ambiente protegido e aos 60 dias após transplante (DAT) em condições de campo empregando uma escalas de notas para quantificar a característica AVS. Baseando-se na porcentagem de plantas infectadas aos 45 DAI em ambiente protegido e aos 60 DAT em campo foi avaliada a incidência da doença (ID). A partir de primers específicos para os genes *Ty-2* e *Ty-3*, foram amplificados fragmentos por PCR para confirmar a presença ou ausência dos alelos dos genes nas subamostras avaliadas. A análise de sequência completa de nucleotídeos do DNA-A do vírus detectado em campo indicou ser o *Tomato severe rugose virus* (uma das espécies do complexo de begomovirus que infecta o tomateiro no Brasil). As sequências obtidas foram usadas para comparações com begomovirus previamente descritos em análise filogenética e análise de recombinação. A estrutura genética e os testes de neutralidade da população de ToSRV evidenciou variabilidade genética se comparada com outras

populações já descritas no Brasil, mostrando valores negativos de neutralidade o que sugere a ocorrência de seleção negativa (purificadora) ou uma recente expansão da população. Como resultado das amplificações identificou-se a presença de marcadores relacionados ao alelo do gene *Ty-2* em heterozigose na subamostra BGH-6881 e ao alelo do gene *Ty-3* em três subamostras (BGH-6878, BGH-6881 e BGH-6897). Com base nos resultados da ANOVA nas avaliações em ambiente protegido e no campo observou-se que a variáveis notas de sintomas visuais foi altamente significativa ($P < 0.01$) ao diferenciar todos os genótipos avaliados em ambas as condições experimentais e em diferentes intervalos de avaliação. As subamostras foram divididas em dois grandes grupos mediante o teste de Skott & Knot. Correlações de Pearson (ρ) altas foram encontradas entre os dados visuais e infecção viral (0,67 em ambiente protegido e 0,60 em campo). Pelo comportamento diferenciado das subamostras em ambas as condições experimentais, concluiu-se que em condições de ambiente protegido destacaram-se as subamostras BGH-2144, BGH-2150, BGH-6878 e BGH-6881 e em condições de campo as subamostras BGH-2080 e BGH-6881, todas elas ao considerar baixa incidência de geminivírus e poucos níveis de replicação. O bom comportamento da subamostra BGH-6881 pode ser atribuído a presença dos genes *Ty-2* e *Ty-3* presentes nela, porém, se comparado com as outras subamostras portadoras do gene *Ty-3*, pode-se afirmar que o gene *Ty-2* foi o responsável pela resistência obtida ao ToYSV em ambiente protegido e ao ToSRV em campo, ou a combinação dos dois genes esta favorecendo a resposta da subamostra a begomovírus. Ao considerar as respostas em ambas as condições experimentais, as variáveis avaliadas, a incidência da doença e a presença dos genes *Ty-2* e *Ty-3*, pode-se concluir que as subamostras BGH-2080 e BGH-6881 são recomendadas como germoplasma promissores a serem empregados nos programas de melhoramento pelo seu desempenho em ambiente protegido e no campo, e podem servir de base para a produção de cultivares mais resistentes a geminivírus no Brasil. A presença do ToSRV no campo e a confirmação de eventos de recombinação permitem afirmar que o contínuo monitoramento da evolução das populações de vírus no campo vai permitir traçar estratégias futuras de controle e de epidemiologia dos begomovírus em nas principais regiões produtoras de tomate no Brasil.

ABSTRACT

GONZÁLEZ AGUILERA, Jorge, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2011. **Search for resistance genes of bipartite geminivirus in tomato subsamples of BGH-UFV, and its response in a greenhouse and field.** Adviser: Derly José Henriques da Silva. Co- Advisers: Everaldo Gonçalves de Barros and Francisco Murilo Zerbini Júnior.

The begomoviroses transmitted by whitefly (*Bemisia tabaci*) are among the main causes of losses in tomato in Brazil. To avoid damage and losses in tomato, it has been used resistant cultivars and hybrids, most of them carrying only the *Ty-1* gene that provides tolerance to begomovirus in the country. In the world, the genes *Ty-1*, *Ty-2* and *Ty-3*, and recently *Ty-3a* allele, and the genes *Ty5* and *Ty4* have been used in crop improvement programs. Ninety-four tomato accessions from the Vegetables Germplasm Bank of the Federal University of Viçosa (BGH-UFV) were evaluated under greenhouse and field conditions for resistance to bi segmented begomovirus present in Brazil, inoculated by biobalistic and via natural infection. Visual evaluations of symptoms (AVS) and confirmation of viral infection (IVC) by means of non-radioactive hybridization were performed at 15, 30 and 45 days after inoculation (DAI) under greenhouse conditions and 60 days after transplanting (DAT) under field conditions using a rating scale to quantify the AVS characteristic. Based on the percentage of infected plants at 45 DAI under greenhouse and at 60 DAT under field conditions, it was evaluated the incidence of the disease (ID). From the specific primers for genes *Ty-2* and *Ty-3*, fragments were amplified by PCR to confirm the presence or absence of alleles of the genes evaluated in the accessions. The analysis of the complete sequence of nucleotides of the DNA-virus detected in the field indicated to be the *Tomato severe rugose virus* (a complex of species of begomovirus infecting tomato in Brazil). The sequences obtained were used for comparisons with previously described begomoviruses in phylogenetic and recombination analysis. The genetic structure and neutrality tests of ToSRV population showed genetic variability compared with other populations that had already been described in Brazil, showing negative values of neutrality which suggests the occurrence of negative selection (purifying) or a recent population expansion. As a result of the amplifications, it was identified the presence of markers

related to allele *Ty*-2 gene in heterozygous in the accession BGH-6881 and the allele *Ty*-3 gene in three accessions (BGH-6878, BGH-6881 and BGH-6897). Based on the results of the ANOVA on the evaluations under greenhouse and field conditions, it was observed that the variables scores of visual symptoms was highly significant ($P < 0.01$) to differentiate all genotypes in both experimental conditions and at different intervals of evaluation. The accessions were divided into two groups by the Skott & Knot test. High Pearson correlations (ρ) were found between visual data and viral infection (0.67 under greenhouse environment and 0.60 in the field). By the different behavior of the accessions in both experimental conditions, it was concluded that under greenhouse environment, the best results were found in the accessions BGH-2144, BGH-2150, BGH 6878 and BGH-6881 and, under field conditions, in the accessions BGH-2080 and BGH-6881, all of them with low incidence and few geminivirus replication levels. The good performance of the accession BGH-6881 can be attributed to the presence of allele *Ty*-2 and *Ty*-3 genes, but compared to other accessions carrying the allele *Ty*-3 gene, it can be stated that the allele *Ty*-2 gene was responsible for the resistance to ToYSV obtained in greenhouse and to ToSRV in the field, or the combination of two genes that favor the response of the accession to begomoviruses. Considering the responses in both experimental conditions, the variables, the incidence of the disease and the presence of genes *Ty*-2 and *Ty*-3, it can be conclude that the accessions BGH-2080 and BGH-6881 are recommended as promising germplasm to be used in breeding programs because of their performance under greenhouse and field conditions, and can serve as basis for the production of crops better resistant to geminivirus in Brazil. The presence of ToSRV in the field and the confirmation of recombination events turn it possible to say that the constant monitoring of the evolution of the virus populations in the field will enable to design future strategies of control and epidemiology of begomoviruses in the main tomato-producing regions in Brazil.

INTRODUÇÃO GERAL

O tomate pertence à família *Solanaceae* que abrange muitas espécies cultivadas (batata, pimentão, berinjela e petúnia), além de plantas daninhas como a beladona (*Atropa belladonna*) e a erva-moura (*Solanum nigrum*). Essas espécies estão distribuídas em aproximadamente 90 gêneros (D'arcy, 1979), os quais são divididos em três subfamílias *Cestoideae*, *Solanoideae*, e *Anthocercideae*, com base nos padrões de desenvolvimento do embrião (Taylor, 1986).

O tomateiro é a segunda hortaliça mais cultivada no mundo, sendo superada somente pela batata. A produção mundial de tomate em 2009 foi de 152.9 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2011). O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores desta hortaliça, com área colhida de aproximadamente 67 mil ha em 2009 e produção de cerca de 4.310.480,00 toneladas, com produtividade média de 63,76 t ha⁻¹ ou cerca de 5 kg/planta ou 245 caixas/mil pés de tomate (AGRIANUAL2010, 2010); (FAOSTAT, 2011). Pode-se afirmar que, nos últimos 20 anos, a tomaticultura brasileira duplicou a produtividade. Já se tem, atualmente, produtores e sistemas de cultivo, que alcançam rendimento superior a 100 toneladas por hectare, o equivalente a cerca de 9 kg por planta ou mais de 400 caixas por mil plantas. Também no Brasil, produtores de tomate em ambiente protegido têm alcançado rendimentos expressivos, acima de 500 caixas de 22 kg em ambiente protegido de 350 m² (ABCSEM, 2011).

No Brasil o tomate é um produto de relevância econômica e social, por ser cultivado tanto por agricultores de subsistência como por produtores que empregam alta tecnologia. A cultura do tomateiro é uma das poucas culturas onde as pragas e doenças são igualmente importantes. Segundo estudo realizado pela ABCSEM (ABCSEM, 2011), é empregado em torno de 21 % do custo de produção na compra de agroquímicos para o controle das pragas e doenças na cultura do tomateiro.

Em relação às pragas, ao lado da traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick), a mosca-branca (*Bemisia* sp.) vem sendo considerada uma das mais importantes pragas da cultura, não somente pelo dano direto causado pelo inseto, mas pelo fato de ser vetor (transmissor) de geminivirose durante o período de alimentação. A mosca-branca (*Bemisia tabaci* biótipo B) é um inseto sugador de seiva, pertencente à ordem

Hemiptera e família Aleyrodidae, sendo considerada uma das principais pragas da cultura do tomateiro..

Na década dos anos 90, ocorreu a introdução de um novo biótipo de mosca-branca no Brasil, denominado biótipo B, responsável pela transmissão do vírus de outras culturas para o tomateiro ocasionando danos severos na cultura (Lourenção & Nagai, 1994). Popularmente a mosca-branca biótipo B é denominada mosca-branca da folha prateada e a diferencia do biótipo A é capaz de apresentar maior fecundidade, completar seu ciclo em plantas de tomate, ocorrer em maior diversidade de plantas cultivadas e induzir alterações fitotóxicas em cucurbitáceas, tomate e brócolis, o que tem justificado sua rápida disseminação no Brasil (Ambrozevicius, 2000; Ávila et al., 2004; Fancelli et al., 2003; Lima et al., 2001; Lourenção & Nagai, 1994; Santos et al., 2003). No Brasil os primeiros relatos de viroses transmitidas por *Bemisia tabaci* foram feitos à década de 1930, 1940 e 1950.

Costa (1975) relatou o primeiro geminívirus na da cultura do tomate que foi descrito como Mosaico dourado do tomateiro (*Tomato golden mosaic virus*, TGMV) que não ocasionava danos econômicos na cultura (Matyis et al., 1975).

A família *Geminiviridae* é composta por vírus de plantas com genoma de DNA circular de fita simples e encapsidado em partículas icosaédricas germinadas (Stanley et al., 2005). A família é dividida em quatro gêneros (*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocovirus* e *Begomovirus*) de acordo tipo de inseto vetor, planta hospedeira, organização do genoma e filogenia (Stanley et al., 2005). Os vírus classificados dentre do gênero *Begomovirus* são transmitidos por mosca branca (*Bemisia tabaci* -Homoptera: Aleyrodidae) e infectam plantas dicotiledôneas podendo ter um ou dois componentes genômicos sendo relatada a existência de 196 espécies do gênero que afetam diversas culturas (ICTV, 2009). Nas últimas décadas esta família *Geminiviridae* tem sido relatada como o grupo de vírus mais agressivo considerados como um grupo emergente de vírus de plantas em regiões tropicais e subtropicais, causando grandes perdas econômicas em cultivos de interesse agrícola (Morales & Anderson, 2001; Monci et al., 2002; Briddon et al., 2003).

A partir de 1994, os begomovírus ganharam importância econômica, quando ocorreu a introdução de uma nova raça de mosca-branca no país denominado Biótipo B. Essa raça, denominada até então *Bemisia argentifolii*, foi à responsável pela transmissão do vírus de outras plantas infectadas para o tomateiro (Melo, 1992; Villas-Bôas et al., 2002). Em decorrência do aumento populacional da mosca-branca,

tem ocorrido aumento na incidência de begomovirose ocasionadas pela transmissão natural de geminivírus por esses insetos, tornando-se um dos principais problemas na cultura do tomateiro no Brasil (Lima et al., 2001; Lourenção & Nagai, 1994; Santos et al., 2003).

Ações que reduzem a população do vetor, por tratamento químico ou controle biológico, ou que decrescem a eficiência da transmissão, têm sido usadas no controle desses patógenos. Como relatado até o ano 1994 era só reportado o TGMV, mas até 2009 já foram reportados dezesseis espécies de geminivírus infectando o tomateiro no Brasil: *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato mottle leaf curl virus* (TMoLCV), *Tomato crinkle virus* (ToCrV), *Tomato infectious yellows virus* (TIYV), *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), e *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), *Tomato mild mosaic virus* (ToMIMV), *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV), *Tomato leaf distortion virus* (ToLDV), *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), *Tomato chlorotic vein virus* (TCIVV), *Tomato crinkle leaf yellow virus* (ToCrLYV), *Sida mottle virus* (SiMoV) e *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV) (Andrade et al., 2005; Cotrim et al., 2007; Colariccio et al., 2006; Della Vecchia et al., 2007; Fernandes et al., 2008). Algumas delas estão presentes em várias regiões do país enquanto outras são restritas a determinadas regiões (Zerbini, 2006).

Entretanto, o elevado grau de variabilidade faz do Brasil um centro de origem e diversidade genética de begomovírus, onde o uso de cultivares resistentes é o método mais promissor de controle dessas begomovirose (Ferraz et al., 2003; Ferreira et al., 1999; Lourenção et al., 2004; Matos et al., 2003), comparado ao controle de plantas daninhas, utilização de mudas livres de vírus, controle da mosca branca e período livre de tomateiro no campo (Zerbini, 2006).

Durante o processo de domesticação do tomateiro, houve perda de alelos importantes, principalmente para resistência a pragas e doenças, provocando um estreitamento na base genética, o que é um dos motivos para explicar a suscetibilidade das atuais cultivares a inúmeros patógenos e pragas (Silva et al., 2001). Uma forma segura e bem eficaz de minorar os danos de pragas e doenças é a utilização de variedades resistentes ao Geminivírus, que funcionam como um seguro ao produtor, dando a garantia de produção e evitando maiores perdas na lavoura, que podem atingir até 100%, dependendo da intensidade da infecção e agressividade da doença (Alcântara, 2009).

O cenário atual de variedades disponíveis no mercado brasileiro mostra que em sua maioria estas variedades são principalmente portadoras do gene *Ty-1*, que confere resistência ao *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), um begomovírus com genoma monossegmentado que não ocorre no Brasil (classificado como praga quarentenária A1). O TYLCV é o begomovírus mais agressivo em tomateiro em todas as regiões onde ocorre, daí a importância de se incorporar fontes de resistência a este vírus nas variedades e híbridos disponíveis no mercado brasileiro (Santana et al., 2001). Além disso, o gene *Ty-1* oferece tolerância aos vírus com genoma bissegmentado que são predominantes no Brasil (Santana et al., 2001).

Zamir et al. (1994) descreveram o gene *Ty-1* a partir da espécie *S. chilense* localizado no cromossomo 6. A busca de novas fontes ou genes de resistência levou à descoberta e introgressão dos genes *Ty-2* e *Ty-3*, localizados nos cromossomos 11 e 6 das espécies silvestres *S. habrochaites* e *S. chilense*, respectivamente, e que, como o *Ty-1*, conferem resistência a diferentes isolados de TYLCV (Hanson et al., 2006; Ji et al., 2007). Mais recentemente já foram descritos os genes de resistência *Ty-4* e *Ty-5* identificados no cromossomo 3 e 4 das espécies *S. chilense* e *S. peruvianum*, pelo autores Ji et al. (2009) e Anbinder et al. (2009), respectivamente.

A procura e caracterização de genes de resistência descritos em outras partes do mundo, principalmente ao TYLCV, podem contribuir para um melhor controle de begomovirose no campo nas condições atuais de Brasil. A introdução de novos materiais ou a procura dentre os materiais conservados nos Bancos de Germoplasma brasileiros, podem também ajudar nos programas de melhoramento visando obter novos genótipos resistentes a begomovírus.

A FAO identificou cerca de 1.300 bancos de genes ou germoplasma, preservando mais de 5.5 milhões de subamostras; deles 78.000 subamostras de tomate (Fraleigh, 2006). Os bancos de germoplasma constituem uma forma de conservação *ex situ* dos recursos genéticos, sendo fundamentais na conservação de materiais que apresentam desempenhos agrônômicos que permitam melhorar a produtividade e a resistência a diversas pragas e doenças, contribuindo assim ao desenvolvimento nacional, segurança alimentar e redução da utilização de insumos agrícolas. Tem sido demonstrada em inúmeras pesquisas que esses recursos genéticos aglutinam alta variabilidade genética, porém é necessário caracterizá-los, avaliá-los e catalogá-los para poder disponibilizar-los para a comunidade científica e dessa forma fazer um melhor emprego dos mesmos em programas de melhoramento para

desenvolver variedades superiores (Silva et al., 2001).

Subamostras de *S. lycopersicum* conservadas no Banco de Germoplasma de Hortaliças (BGH) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) têm sido utilizadas de forma sistemática na busca de fontes de resistência a pragas e doenças (Silva et al., 2001), das quais foram identificadas até o momento seis fontes de resistência para *Tuta absoluta* (Suinaga et al., 2003; Oliveira et al., 2009), uma para *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) (Juhasz et al., 2006), três a *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) (Moura et al., 2005), seis a *Bemisia tabaci* biótipo B (Fernandes et al., 2009), uma a *Phytophthora infestans* (Abreu et al., 2008) e três a *Tomato yellow spot virus*, (ToYSV) (Aguilera et al., 2008; Aguilera et al., 2011).

Este trabalho teve como objetivos determinar a presença dos genes de resistência *Ty-2* e *Ty-3* em 95 subamostras de tomate do Banco de Germoplasma de Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa (BGH-UFV) e sua resposta em condições de ambiente protegido com inoculação do ToYSV e em condições de campo com infecção natural, assim como, determinar a estrutura genética de populações de begomovírus obtidas em dois anos consecutivos (2009-2010) infectando tomateiro no estado de Minas Gerais, Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABCSEM (2011) Projeto para o levantamento dos dados socioeconômicos da cadeia produtiva de hortaliças no Brasil, 2010/2011. In. Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas (ABCSEM), p 22.
- Abreu FB, Silva DJH, Cruz CD and Mizubuti ESG (2008) Inheritance of resistance to *Phytophthora infestans* (Peronosporales, Pythiaceae) in a new source of resistance in tomato (*Solanum* sp. (formerly *Lycopersicon* sp.), Solanales, Solanaceae). Genetics and Molecular Biology 31:493-497.
- AGRIANUAL2010 (2010) Anuário da agricultura brasileira. Tomate, FNP, São Paulo, p.348-491.
- Aguilera JG, Alves Júnior M, Elsayed AYAM, Flores MP, Silva DJH and Zerbini FM (2008) Screening for resistance to *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) germplasm using two methods of inoculation. Egyptian Journal of Agricultural Research 86:1207-1216.
- Aguilera JG, Malta AWO, Flores MP, Almeida VO, Nick C, Xavier CAD, Silva DJH and Zerbini FM (2011) Characterization of the resistance of tomato accessions

- from the BGH-UFV to the geminivirus *Tomato yellow spot virus*. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável* 1: 66-70.
- Alcântara TT (2009) Produtores de tomate devem ficar atentos para evitar Geminivirus. In, *Noticias Agricolas*.
- Ambrozevicius LP, Andrade EC, Calegario RF, Fontes EPB, Zerbini FM (2000) Molecular cloning and characterization of TGV-Ig, a tomato-infecting *Begomovirus* from Minas Gerais state. *Virus Reviews and Research* 5 (Supplement):196
- Anbinder I, Reuveni M, Azari R, Paran I, Nahon S, Shlomo H, Chen L, Lapidot M and Levin I (2009) Molecular dissection of *Tomato leaf curl virus* resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 119:519-530.
- Andrade EC, Manhani GG, Fontes EPB and Zerbini FM (2005) Pseudorecombination between *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV) and other begomoviruses. In: 38º Congresso Brasileiro de Fitopatologia. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, DF, pp S190-S190.
- Ávila AC, Inoue-Nagata AK, Costa H, Boiteux LS, Neves LO, Prates RS and Bertini LA (2004) Ocorrência de viroses em tomate e pimentão na região serrana do estado do Espírito Santo. *Horticultura Brasileira* 22:655-658.
- Bridson RW, Bull SE, Amin I, Idris AM, Mansoor S, Bedford ID, Dhawan P, Rishi N, Siwatch SS, Abdel-Salam AM, Brown JK, Zafar Y and Markham PG (2003) Diversity of DNA beta, a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Virology* 312:106-121.
- Castillo-Urquiza, G.P.; Beserra JR., J.E.A.; Bruckner, F.P.; Lima, A.T.M.; Varsani, A.; Alfenas-Zerbini, P.; Zerbini, F.M. (2008) Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Archives of Virology*, New York 153:1985-1989.
- Colariccio A, Bergmann JC, Eiras M, Chaves ALR, Chagas CM and Zerbini FM (2006) *Tomato rugose mosaic virus* in tomato crops in São Paulo State, Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 31:4036.
- Costa A (1975) Increase in the populational density of *Bemisia tabaci*, a threat to widespread virus infection of legume crops in Brazil. In: Bird J, Maramorosch K (eds) *Tropical Diseases of Legumes* In. Academic Press: New York, New York, pp 27-50.

- Cotrim AA, Krause-Sakate R, Narita N, Zerbini FM and Pavan MA (2007) Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista. *Summa Phytopathologica* 33:300-303.
- D'arcy WG (1979) Solanaceae studies. In: *The Biology and taxonomy of the Solanaceae*. Academic Press, London, pp 3-47.
- Della-Vecchia MGS, Rosa DD, Bergamin Filho A, Amorim L, Rezende JAM and Ribeiro A (2007) Dinâmica temporal e espacial da begomovirose causada por *Tomato yellow vein streak virus* em tomateiro na região de Campinas-SP. *Summa Phytopathologica* 33:388-396.
- Fancelli M, Vendramim J, Lourenção AL and Dias C (2003) Atractividade e preferência para ovoposição de *Bermisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) Biotipo B em genótipos de tomateiro. *Neotropical Entomology* 32:319-328.
- FAOSTAT (2011) FAO Dirección de Estadística 2011. In. FAO.
- Fernandes F, de Albuquerque L, de Britto Giordano L, Boiteux L, de Azevedo A, Inoue-Nagata A (2008) Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36 (1):251-258
- Fernandes MES, Silva DJH, Fernandes FL and Picanço MC (2009) Novos acessos de tomateiro resistentes à mosca-branca biótipo B. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44:1545-1548.
- Ferraz E, Resende LV, Lima GS, Silva MC, França JG and Silva. DJ (2003) Redenção: nova cultivar de tomate para a indústria resistente a geminivírus e tospovírus. *Horticultura Brasileira* 21:578-580.
- Ferreira PTO, Bezerra IC, Villas-Boas GL, Ribeiro SG, Giordano LB (1999) Avaliação de fontes de resistência a isolado de geminivírus com genoma bipartido transmitido por *Bemisia argentifolli* em *Lycopersicon spp.* *Fitopatologia Brasileira* 24:131-135
- Fraleigh B (2006) Global overview of crop genetic resources. In: Ruane J, Sonnino A (eds) *The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources*. Divisão de Informação da FAO, Roma, Italia, pp 21-31.
- Hanson PM, Green SK and Kuo G (2006) *Ty-2*, a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. *Tomato Genetics Cooperative Report* 56:17-18.
- ICTV (2009) Virus Taxonomy: 2009 Release. In: ICTV (ed) *International Committee*

- on Taxonomy of Viruses (ICTV).
- Ji Y, Schuster D and Scott J (2007) *Ty-3*, a begomovirus resistance locus near the *Tomato yellow leaf curl virus* resistance locus *Ty-1* on chromosome 6 of tomato. *Molecular Breeding* 20:271-284.
- Ji Y, Scott JW, Schuster DJ and Maxwell DP (2009) Molecular mapping of *Ty-4*, a new *Tomato yellow leaf curl virus* resistance locus on chromosome 3 of tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 134:281-288.
- Juhasz ACP, da Silva DJH, Zerbini FM, Soares BO and Aguilera GA (2006) Screening of *Lycopersicon* sp accessions for resistance to *Pepper yellow mosaic virus*. *Scientia Agricola* 63:510-512.
- Lima MF, Bezerra IC, Ribeiro SG and Ávila AC (2001) Distribuição de geminivírus nas culturas do tomate e pimentão em doze municípios do Submédio do Vale do São Francisco. *Fitopatologia Brasileira* 26:81-85.
- Lourenção AL, Melo AM, Siqueira WL, Colariccio A and Melo PC (2004) Avaliação da resistência de acessos de tomateiro a tospovírus e a geminivírus. *Horticultura Brasileira* 22:193-196.
- Lourenção AL and Nagai H (1994) Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. *Bragantia* 53:53-59.
- Matos E, Siqueira W, Lourenção A, Melo A, Sawazaki H, Sousa-Dias J and Colariccio A (2003) Resistência de genótipos de tomateiro a um isolado de geminivírus do cinturão verde de Campinas, São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 28:159-165.
- Matyis JC, Silva DM, Oliveira AR and Costa AS (1975) Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. *Summa Phytopathologica* 1:267-275.
- Melo PCT (1992) Mosca branca ameaça produção de hortaliças. In: Asgrow do Brasil Sementes Ltda., Technical Bulletin, Campinas, SP, Brazil.
- Monci F, Sanchez-Campos S, Navas-Castillo J and Moriones E (2002) A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology* 303:317-326.
- Morales FJ and Anderson PK (2001) The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology* 146:415-441.
- Morales FJ and Jones PG (2004) The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Research* 100:57-65.

- Moura MCCL, Zerbini FM, Silva DJH and Queiroz MA (2005) Reação de acessos de *Cucurbita* sp. ao *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV). *Horticultura Brasileira* 23:206-210.
- Naranjo SE and Ellsworth PC (2001) Challenges and opportunities for pest management of *Bemisia tabaci* in the new century. *Crop Protection* 20:707-707.
- Oliveira FA, da Silva DJH, Leite GLD, Jham GN and Picanço M (2009) Resistance of 57 greenhouse-grown accessions of *Lycopersicon esculentum* and three cultivars to *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Scientia Horticulturae* 119:182-187.
- Santana FM, Ribeiro SG, Moita AW, Moreira DJ and Giordano LB (2001) Sources of resistance in *Lycopersicon* spp. to a bipartite whitefly-transmitted geminivirus from Brazil. *Euphytica* 122:45-51.
- Santos CD, Àvila AC and Resende RO (2003) Estudo da interação de um begomovírus isolado de tomateiro com a mosca branca. *Fitopatologia Brasileira* 28:664-673.
- Silva DJ, Moura MC and Casali VW (2001) Recursos genéticos do banco de germoplasma de hortaliças da UFV: Histórico e expedições de coleta. *Horticultura Brasileira* 19:108-114.
- Stanley J, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Fauquet CM, Harrison BD, Rybicki EP and Stenger DC (2005) Family Geminiviridae. In: Fauquet CM, Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. e Ball, L.A. (ed) *Virus Taxonomy Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp 301-326.
- Suinaga FA, Casali VW, Silva DJ and Picanço MC (2003) Dissimilaridade genética de fontes de resistência de *Lycopersicon* spp. a *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Brasileira de Agrociência* 9:371-376.
- Taylor IB (1986) Biosystematic of the tomato. In: Atherton JG, Rudich J (eds) *The tomato crop: a scientific basis for improvement*, London, pp 1-34.
- Villas-Bôas GL, França FH and Macedo N (2002) Potencial biótico da mosca-branca *Bemisia argentifolii* a diferentes plantas hospedeiras. *Horticultura Brasileira* 20:71-79.
- Zamir D, Ekstein-Michelson I, Zakay Y, Navot N, Zeidan M, Sarfatti M, Eshed Y, Harel E, Pleban T, van-Oss H, Kedar N, Rabinowitch HD and Czosnek H (1994) Mapping and introgression of a *Tomato yellow leaf curl virus* tolerance gene,

TY-1. TAG Theoretical and Applied Genetics 88:141-146.

Zerbini FM (2006) Manejo de viroses: um desafio para o produtor e para o pesquisador. In: Brasileira F (ed) 39º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Salvador, BA, pp S11-S13.

**Capitulo I. IDENTIFICAÇÃO DOS GENES *Ty-2* E *Ty-3* QUE
CONFEREM RESISTÊNCIA A *BEGOMOVÍRUS* EM
TOMATEIRO (*SOLANUM* spp. SEÇÃO *LYCOPERSICUM*)**

Identificação dos genes *Ty-2* e *Ty-3* que conferem resistência a *Begomovírus* em tomateiro (*Solanum* spp. seção *Lycopersicum*)

Jorge González Aguilera⁽¹⁾, Francisco Dueñas Hurtado⁽³⁾, Cesar Augusto Diniz Xavier⁽⁴⁾, Bruno Soares Laurindo⁽²⁾, Carlos Nick⁽²⁾, Marta Álvarez Gil⁽³⁾, Derly José Henriques da Silva⁽²⁾ e Francisco Murilo Zerbini⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Viçosa (UFV), CEP 36570-000, Viçosa, MG, Brasil. E-mail: j51173@yahoo.com. ⁽²⁾ Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa (UFV), CEP 36570-000, Viçosa, MG, Brasil. E-mail: brunoslaurindo@yahoo.com.br, karlnickbr@yahoo.com.br, derly@ufv.br. ⁽³⁾ Genética y Mejora de Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), La Habana, Cuba. E-mail: franko@inca.edu.cu, malvarez@inca.edu.cu. ⁽⁴⁾ Fitopatologia, Laboratório de Virologia Vegetal Molecular (LVVM), BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa (UFV), CEP 36570-000, Viçosa, MG, Brasil. E-mail: cesar.xavier@ufv.br, zerbini@ufv.br

Resumo

Os vírus pertencentes ao gênero *Begomovírus* (família *Geminiviridae*), transmitidos pela mosca-branca (*Bemisia tabaci*), são uns dos patógenos que causam as maiores perdas na cultura do tomateiro no campo. Nos programas de melhoramento genético da cultura a procura e introgressão de genes de resistência a begomovirose provenientes de espécies silvestres pertencentes ao gênero *Solanum*, têm se tornado uma das principais alternativas no manejo destas doenças. O objetivo deste trabalho foi identificar a presença dos genes *Ty-2* e *Ty-3*, que conferem resistência a *Begomovírus*, em 95 subamostras do Banco de Germoplasma de Hortaliças (BGH) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Oligonucleotídeos TO302 F/R e FLUW25 F/R foram utilizados em reações de PCR para verificar a presença de marcadores relacionados aos alelos dos genes *Ty-2* e *Ty-3*, respectivamente. Do total de subamostras testadas a presença dos alelos do gene *Ty-2* foi obtida somente em heterozigose na subamostra BGH-6881 (*S. peruvianum*). Os alelos do gene *Ty-3* foram também detectados nas subamostras BGH-6878 e BGH-6897 (ambas *S. lycopersicum*) e BGH-6881. A subamostra BGH-6881 possui, portanto, os dois genes analisados (*Ty-2* e *Ty-3*). A identificação de ambos os genes em subamostras sugere a possibilidade de acesso a genótipos portadores de genes de resistência distintos dos já introduzidos nas cultivares brasileiras, o que permitiria traçar novas estratégias de melhoramento na cultura do tomateiro.

Termos para indexação: geminivírus, recursos genéticos, *Solanum lycopersicum*, *Solanum peruvianum*, PCR.

37
38 **Identification of the Ty-2 and Ty-3 genes which confer resistance to**
39 **begomoviruses in tomato (*Solanum* spp. section *Lycopersicum*)**

40 **Abstract**

41 Viruses of the genus *Begomovirus* (family *Geminiviridae*) transmitted by whitefly
42 (*Bemisia tabaci*), are one of the pathogens that cause major losses in tomato growing
43 under field conditions. In breeding programs of this crop, the search and
44 introgression of resistance genes from wild species of begomoviruses of the genus
45 *Solanum*, have become one of the main alternative in the management of these
46 diseases. The objective of this study was to identify the presence of genes *Ty-2* and
47 *Ty-3*, which confer resistance to begomoviruses in 94 accessions of the Vegetables
48 Germplasm Bank (BGH) from the Federal University of (UFV). Oligonucleotides
49 TO302 F/R and FLUW25 F/R were used in PCR reactions to verify the presence of
50 marker related to the alleles of the genes *Ty-2* and *Ty-3*, respectively. From the total
51 number of accessions tested, the presence of alleles of the gene *Ty-2* was obtained
52 only in heterozygosity in the accession BGH-6881 (*S. peruvianum*). The alleles of
53 the gene *Ty-3* were also detected in accessions BGH-6878 and BGH-6897 (both *S.*
54 *lycopersicum*) and BGH-6881. The accession BGH-6881 has, therefore, the two
55 genes analyzed (*Ty-2* and *Ty-3*). The identification of genes in both accessions
56 suggests the possibility of access to genotypes carrying distinct resistance genes from
57 those already introduced in Brazilian cultivars, which would outline new strategies
58 on tomato breeding programs.

59 **Index terms:** geminivirus, genetic resources, *Solanum lycopersicum*, *Solanum*
60 *peruvianum*, PCR.

61
62 **INTRODUÇÃO**

63 O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma das hortaliças mais importantes no
64 mundo, devido ao seu papel fundamental nos hábitos alimentícios de uma ampla
65 parte da população mundial.

66 A cultura apresenta suscetibilidade a uma ampla gama de fatores bióticos e
67 abióticos que influenciam negativamente a produtividade, fato que tem sido
68 favorecido pelo processo de domesticação da espécie ao longo dos anos (Vidavsky et
69 al., 2006). Dentre os fatores bióticos, reportam-se mais de 200 agentes
70 fitopatogênicos de origem fúngica, bacteriana e viral que afetam a cultura (Fooland,

2007). Os vírus pertencentes ao gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*), transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci*, são alguns dos patógenos que causam as maiores perdas no campo em nível global (Pérez de Castro et al., 2007).

Considerando-se a vulnerabilidade dos genótipos cultivados e a ocorrência de novas espécies de begomovírus no campo (Ambrozevicius et al., 2002; Ribeiro et al., 2003; Castillo-Urquiza et al., 2008), os programas de melhoramento genético têm como objetivo a procura e introgressão de genes de resistência a begomovirose provenientes de espécies silvestres pertencentes ao gênero *Solanum*, como uma das alternativas mais duradouras e eficientes em comparação com outras estratégias de manejo (González-Cabezuelo et al., 2007).

As atuais cultivares disponíveis no mercado brasileiro são principalmente portadoras do gene *Ty-1*, que confere resistência ao *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), um begomovírus com genoma monossegmentado que não ocorre no Brasil (classificado como praga quarentenária A1). O TYLCV é o begomovírus mais agressivo em tomateiro em todas as regiões onde ocorre, daí a importância de se incorporar fontes de resistência a este vírus nas variedades e híbridos disponíveis no mercado brasileiro (Santana et al., 2001). Além disso, o gene *Ty-1* oferece tolerância aos vírus com genoma bissegmentado que são predominantes no Brasil. A busca de novas fontes ou genes de resistência levou à descoberta e introgressão dos genes *Ty-2* e *Ty-3*, localizados nos cromossomos 11 e 6 das espécies silvestres *S. habrochaites* e *S. chilense*, respectivamente, e que, como o *Ty-1*, conferem resistência a diferentes isolados de TYLCV (Hanson et al., 2006; Ji et al., 2007).

A procura destes genes em materiais presentes nos Bancos de Germoplasma brasileiros e sua introgressão em materiais comerciais podem contribuir para um melhor controle de begomovirose no campo nas condições do Brasil.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a presença dos genes *Ty-2* e *Ty-3* em 95 subamostras do Banco de Germoplasma de Hortaliças (BGH) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

MATERIAL E MÉTODOS

Condições experimentais

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Virologia Vegetal Molecular do BIOAGRO-UFV, empregando 94 subamostras de tomateiro (*Solanum* spp. seção *Lycopersicum*) do Banco de Germoplasma de Hortaliças (BGH) (www.bgh.ufv.br) da

105 UFV (Tabela 1).

106 Como padrões negativos (ausência dos genes *Ty-2* e *Ty-3*) foram empregados
107 as cultivares 'Santa Clara' e 'Campbell 28', e os híbridos Débora e Fany. Como
108 padrões positivos foram empregadas as linhagens H24 e LD7, portadores do gene *Ty-*
109 2, e a linhagem STY4, portadora do gene *Ty-3*, cujas sementes foram doadas pelo
110 Instituto Nacional de Ciências Agrícolas (INCA) de Cuba. As mudas foram
111 cultivadas em bandejas até 25 dias após a germinação e transplantadas para vasos
112 plásticos de 1 L de capacidade com terriço de barranco e esterco bovino (2:1)
113 previamente esterilizado.

114 Três plantas de cada material avaliado foram mantidas em condições de casa-
115 de-vegetação do Departamento de Fitopatologia da UFV, a uma temperatura de
116 aproximadamente $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa entre 80-85%. As plantas foram
117 mantidas sob estas condições até o momento da coleta das folhas, no estágio de
118 quatro folhas verdadeiras.

119

120 ***Extração do DNA***

121 O DNA das folhas coletadas foi extraído pelo método de Dellaporta et al.
122 (1983) e sua concentração foi ajustada para 10 ng/ μl após mistura de quantidades
123 iguais de DNA de cada indivíduo coletado em cada subamostra.

124 Para a identificação dos alelos dos genes foram utilizados oligonucleotídeos
125 específicos para os genes *Ty-2* e *Ty-3* descritos por Hanson et al. (2006) e Ji et al.
126 (2007); respectivamente (Tabela 2).

127

128 ***Condições de amplificação dos PCRs***

129 As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 μl ,
130 empregando-se 2,5 μl de tampão 10 $\times$ (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 9,0), 1,5
131 mM de MgCl_2 , 2,5 mM de cada dNTP, 2,5 μM de cada oligonucleotídeo e 1U de Taq
132 DNA polimerase (Invitrogen). As condições de reação e a quantidade de DNA molde
133 foram diferentes para cada par de oligonucleotídeos. Para as reações com o par
134 TO302F/R (amplificação correspondente ao gene *Ty-2*) (Tabela 2), foram utilizados
135 100 ng de DNA e as condições de amplificação consistiram em uma etapa inicial de
136 desnaturação a 94°C durante 5 min, seguida por 35 ciclos (desnaturação a 94°C por
137 30 s, anelamento a 55°C por 1 min e extensão a 72°C por 2 min) e finalizando com
138 uma extensão a 72°C por 10 min. Para as reações com o par FLUW25F/R

139 (amplificação correspondente ao gene *Ty-3*) foram empregados 15 ng de DNA e as
140 condições de amplificação consistiram em uma etapa inicial de desnaturação a 94°C
141 durante 3 min, seguida por 35 ciclos (desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a
142 53°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min) e finalizando com uma extensão a 72°C
143 por 10 min.

144 Os produtos obtidos nas reações de PCR foram analisados em géis de agarose a
145 1.5%, utilizando-se o marcador 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Os genótipos
146 foram classificados em homozigotos (dominantes ou recessivos) e heterozigotos com
147 base nos padrões de amplificação observados.

148

149

RESULTADOS E DISCUSSÃO

150 Com base nas análises das reações de amplificação para o alelo do gene *Ty-2*
151 foi observado que, do total de 94 subamostras avaliadas, apenas a subamostra BGH-
152 6881 (*S. peruvianum*) apresentou o padrão heterozigoto (*Ty-2/ty-2*) (Tabela 1). Esse
153 padrão inclui um fragmento de aproximadamente 950 pb correspondente ao alelo
154 resistente (*Ty-2*), igual ao amplificado a partir dos materiais H24 e LD7 empregados
155 como controles positivos, e um segundo fragmento de aproximadamente 850 pb
156 correspondente ao alelo suscetível (*ty-2*), amplificado a partir dos controles negativos
157 e das demais subamostras.

158 Estudos realizados em Cuba por Dueñas et al. (2008) demonstraram que sob
159 condições de infecção não controlada (livre escolha em condições de campo e sem
160 manejo do inseto vetor) na presença do *isolado cubano* TYLCV-IL [CU], os
161 materiais H24 e CLN2116B apresentaram comportamento de resistência, com
162 ausência dos sintomas característicos do vírus e sem replicação viral, atribuindo-se
163 este comportamento à presença do gene *Ty-2*. A identificação deste gene em material
164 presente no BGH-UFV representa uma nova opção para os programas de
165 melhoramento de tomateiro no Brasil. A introgressão em novos genótipos pode levar
166 a um comportamento similar ao obtido por Dueñas et al. (2008), embora isso deva
167 ser testado nas condições do Brasil frente aos begomovírus bissegmentados aqui
168 presentes.

169 As análises dos padrões de amplificação para o gene *Ty-3* indicou que as
170 subamostras BGH-6878 e BGH-6897 (ambas *S. lycopersicum*) apresentaram padrão
171 homozigoto dominante (*Ty-3/Ty-3*) (Tabela 1), com a amplificação de um fragmento
172 de aproximadamente 640 pb idêntico ao amplificado para o genótipo STY4. Já a

173 subamostra BGH-6881 apresentou padrão heterozigoto, com amplificação do
174 fragmento de 640 pb e de um segundo fragmento com aproximadamente 580 pb
175 aproximadamente, também amplificado a partir dos controles negativos e em todas
176 as demais subamostras. A subamostra BGH-6881 possui, portanto, os dois genes
177 analisados (*Ty-2* e *Ty-3*).

178 O gene *Ty-3* foi originalmente identificado nas subamostras LA 2779 e LA
179 1932, ambas da espécie silvestre *S. chilense*. Este gene tem sido utilizado no
180 programa de melhoramento genético do tomateiro para conferir resistência ao
181 TYLCV e ao *Tomato mottle virus* (ToMoV) na Florida, EUA (Ji et al., 2007).

182 A identificação dos dois genes (*Ty-2* e *Ty-3*) em subamostras do BGH-UFV
183 sugere a possibilidade de acesso a genótipos portadores de genes de resistência
184 distintos, o que permitiria traçar novas estratégias de melhoramento na cultura do
185 tomateiro, a partir da obtenção de híbridos, linhas ou variedades com um amplo
186 espectro de resistência. Além disso, a introgressão do gene *Ty-3* poderia ser realizada
187 rapidamente, pela facilidade de cruzamento que existe entre as subamostras BGH-
188 6878 e BGH-6897, ambas da espécie *S. lycopersicum*. A facilidade de detecção e
189 identificação destes genes de resistência a partir de técnicas simples como a PCR
190 constitui um avanço importante nos programas de melhoramento das viroses
191 transmitidas por mosca-banca (González-Cabezuelo et al., 2007), permitindo a
192 seleção assistida por marcadores nos materiais que se originam dos programas de
193 melhoramento em qualquer um de seus possíveis genótipos (heterozigotos e
194 homozigotos dominantes ou recessivos).

195

196 AGRADECIMENTOS

197 Os autores agradecem à FAPEMIG pela concessão de bolsa de pesquisa ao
198 primeiro autor do trabalho e à CAPES, pelo financiamento do projeto de cooperação
199 bilateral internacional CAPES-MES 067/09.

200

201 REFERÊNCIAS

- 202 Ambrozevicius, L.P.; Calegario, R.F.; Fontes, E.P.B.; Carvalho, M.G.; Zerbini, F.M.
203 Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in
204 Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v.27, p.372-377, 2002.
- 205 Castillo-Urquiza, G.P.; Beserra, J.E.A.; Bruckner, F.P.; Lima, A.T.M.; Varsani, A.;
206 Alfenas-Zerbini, P.; Zerbini, F.M. Six novel begomoviruses infecting tomato and

207 associated weeds in Southeastern Brazil. Archives of Virology, v.153, p.1985-
208 1989, 2008.

209 Dellaporta, S.L.; Wood, J.; Hicks, J.B. A plant DNA miniprep: Version II.
210 Plant Molecular Biology Reporter, v.1, p.19-21, 1983.

211 Dueñas, F.; Martínez, Y.; Álvarez, M.; Moya, C.; Peteira, B.; Arias, Y.; Díez, M. J.;
212 Hanson, P.; Shagardsky, T. Caracterización agromorfológica y evaluación de la
213 resistencia al TYLCV en nuevos genotipos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)
214 como apoyo al programa de mejoramiento genético de la hortaliza para la
215 enfermedad. Cultivos Tropicales, v.29, p.53-60, 2008.

216 Fooland, M. Genome mapping and molecular breeding of tomato. International
217 Journal of Plant Genomics, v. 1, p. 1-52, 2007.

218 González-Cabezuelo, J.M.; Tomás, D.M.; Lorente, I.; Abad, J.; Fernández-Muñoz,
219 R.; Moriones, E.; Lozano, R. Marcadores moleculares ligados a la resistencia a
220 TYLCD en tomate. Acta de Horticultura, n.48, 2007.

221 Hanson, P.M.; Green, S. K.; Kuo, G. *Ty-2*, a gene on chromosome 11 conditioning
222 geminivirus resistance in tomato. Tomato Genetics Cooperative Report, v.56,
223 p.17-18, 2006.

224 Ji, Y.; Schuster, D.J.; Scott, J.W. *Ty-3*, a begomovirus resistance locus near the
225 *Tomato yellow leaf curl virus* resistance locus *Ty-1* on chromosome 6 of tomato.
226 Molecular Breeding, v.20, p.271–284, 2007.

227 Pérez de Castro, A.; Blanca, J.M.; Díez, M.J.; Viñals, F.N. Identification of a CAPS
228 marker tightly linked to the *Tomato yellow leaf curl* disease resistance gene *Ty-1*
229 in tomato. European Journal of Plant Pathology, v.117, p.347-356, 2007.

230 Ribeiro, S.G.; Ambrozecius, L.P.; Ávila, A.C.; Bezerra, I.C.; Calegario, R.F.;
231 Fernandes, J.J.; Lima, M.F.; Mello, R.N.; Rocha, H.; Zerbini, F.M. Distribution
232 and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. Archives of
233 Virology, v.148, p.281-295, 2003.

234 Santana, F.M.; Ribeiro, S.; Moita, A. W.; Moreira, D.J.; Giordano, L.B. Sources of
235 resistance in *Lycopersicon* spp. to a bipartite whitefly-transmitted geminivirus
236 from Brazil. Euphytica, v.122, p.45-51, 2001.

237 Vidavsky, F.; Leviatov, S.; Milo, J.; Rabinowitch, H.D.; Kedar, N.; Czosnek, H.
238 Behaviour of tolerant tomato breeding lines (*Lycopersicon esculentum*)
239 originated from three different sources (*L. peruvianum*, *L. pimpinellifolium* and

240 *L. chilense*) upon early controlled inoculation by Tomato yellow leaf curl virus.
241 Plant Breeding, v.117, p.165-169, 2006.

Tabela 1. Lista dos códigos, espécies e genes identificados nas subamostras de tomateiro do Banco de Germoplasma de Hortaliças (BGH) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) utilizados no trabalho.

No.	Código	Espécie	Genes ^a		No.	Código	Espécie	Genes	
			Ty-2	Ty-3				Ty-2	Ty-3
1	BGH-2062	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	52	BGH-2131	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
2	BGH-2064	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	53	BGH-2132	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
3	BGH-2065	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	54	BGH-2133	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
4	BGH-2068	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	55	BGH-2134	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
5	BGH-2069	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	56	BGH-2135	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
6	BGH-2071	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	57	BGH-2138	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
7	BGH-2072	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	58	BGH-2141	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
8	BGH-2073	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	59	BGH-2143	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
9	BGH-2074	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	60	BGH-2144	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
10	BGH-2075	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	61	BGH-2145	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
11	BGH-2076	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	62	BGH-2146	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
12	BGH-2077	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	63	BGH-2149	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
13	BGH-2078	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	64	BGH-2150	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
14	BGH-2080	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	65	BGH-2151	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
15	BGH-2081	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	66	BGH-2152	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
16	BGH-2082	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	67	BGH-6858	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
17	BGH-2083	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	68	BGH-6859	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
18	BGH-2086	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	69	BGH-6861	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
19	BGH-2087	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	70	BGH-6866	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
20	BGH-2088	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	71	BGH-6867	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
21	BGH-2089	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	72	BGH-6877	<i>S. lycopersicum</i>	-	-

Tabela 1 (cont.)									
22	BGH-2091	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	73	BGH-6878	<i>S. lycopersicum</i>	-	+
23	BGH-2092	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	74	BGH-6880	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
24	BGH-2093	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	75	BGH-6881	<i>S. peruvianum</i>	±	±
25	BGH-2095	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	76	BGH-6884	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
26	BGH-2096	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	77	BGH-6887	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
27	BGH-2097	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	78	BGH-6897	<i>S. lycopersicum</i>	-	+
28	BGH-2098	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	79	BGH-6901	<i>S. habrochaites</i>	-	-
29	BGH-2100	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	80	BGH-6924	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
30	BGH-2102	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	81	BGH-6925	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
31	BGH-2105	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	82	BGH-6926	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
32	BGH-2109	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	83	BGH-6993	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
33	BGH-2110	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	84	BGH-7024	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
34	BGH-2111	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	85	BGH-7192	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
35	BGH-2112	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	86	BGH-7193	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
36	BGH-2113	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	87	BGH-7197	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
37	BGH-2114	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	88	BGH-7213	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
38	BGH-2115	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	89	BGH-7218	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
39	BGH-2116	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	90	BGH-7221	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
40	BGH-2117	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	91	BGH-7222	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
41	BGH-2118	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	92	BGH-7263	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
42	BGH-2120	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	93	BGH-7467	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
43	BGH-2121	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	94	BGH-7466	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
44	BGH-2122	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	95	Campbell 28 ^b	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
45	BGH-2123	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	96	Débora ^b	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
46	BGH-2124	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	97	Fany ^b	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
47	BGH-2125	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	98	Santa Clara ^b	<i>S. lycopersicum</i>	-	-
48	BGH-2127	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	99	H 24 ^c	<i>S. lycopersicum</i>	+	-

Tabela 1 (cont.)

49	BGH-2128	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	100	LD7 ^c	<i>S. lycopersicum</i>	+	-
50	BGH-2129	<i>S. lycopersicum</i>	-	-	101	STY4 ^d	<i>S. lycopersicum</i>	-	+
51	BGH-2130	<i>S. lycopersicum</i>	-	-					

^a Homozigoto dominante (+), heterozigoto (±) e homozigoto recessivo (-); ^b controle negativo para ambos os genes; ^c controle positivo para o alelo dominante do gene *Ty-2*; ^d controle positivo para o alelo dominante do gene *Ty-3*.

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação via PCR de fragmentos de DNA correspondentes aos genes *Ty-2* e *Ty-3*.

Nome	Sequência	Gene correspondente ao fragmento amplificado	Referência
TO302F	5' TGG CTC ATC CTG AAG CTG ATA GCG C 3'	<i>Ty-2</i>	Hanson <i>et al.</i> (2006)
TO302R	5' AGT GTA CAT CCT TGC CAT TGA CT 3'		
FLUW25F	5' CAA GTG TGC ATA TAC TTC ATA TTC ACC 3'	<i>Ty-3</i>	Li <i>et al.</i> (2007)
FLUW25R	5' CCA TAT ATA ACC TCT GTT TCT ATT TCG AC 3'		

**Capítulo II. RESPOSTA DE SUBAMOSTRAS DE TOMATEIRO À
INOCULAÇÃO DE BEGOMOVÍRUS QUE OCOREM NO BRASIL EM
CONDIÇÕES CONTROLADAS E DE CAMPO**

BEGOMOVÍRUS QUE OCOREM NO BRASIL EM CONDIÇÕES CONTROLADAS E DE CAMPO

Jorge González Aguilera¹, Francisco D. Hurtado³, Sheila dos Santos Tavares^{4,5},
Victor de Souza Almeida², Roberto Ramos Sobrinho⁴, Cesar A. D. Xavier⁴, Carlos
Nick², Renata D. de Freitas², Martha A. Gil³, Derly J. H. da Silva², Francisco Murilo
Zerbini⁴

¹Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Viçosa
(UFV), CEP 36570-000, Viçosa, MG, Brasil.

²Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa (UFV), CEP 36570-000,
Viçosa, MG, Brasil;

³Departamento de Genética y Mejora de Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas
(INCA), La Habana, Cuba;

⁴Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Virologia Vegetal Molecular (LVVM),
BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa (UFV), CEP 36570-000, Viçosa, MG, Brasil.

⁵Universidade Federal de Alagoas, Unidade Acadêmica Centro de Ciências Agrárias,
Alagoas, Brasil.

RESUMO

Os begomovírus tem ganhado importância econômica na cultura do tomateiro no Brasil a partir da introdução de um novo biótipo de mosca-branca, biótipo B; tornando-se cada vez mais frequentes nas regiões produtoras. Um total de 94 subamostras de tomateiro pertencentes ao Banco de Germoplasma de Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa (BGH-UFV) foram avaliadas em ambiente protegido (inoculação do *Tomato yellow spot virus* (ToYSV)) e no campo (infecção natural) quanto à resistência a begomovírus bissegmentados presentes no Brasil. Foram realizadas avaliações visuais dos sintomas e confirmada a infecção viral pelo método de hibridização não radioativa. Análises de variância e correlações entre os caracteres foram realizadas. Um total de 36 clones foram obtidos e sequenciados na procura da identificação dos isolados de begomovírus presentes no campo. Como resultado do sequenciamento foi possível identificar em todos os clones o *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), uma das espécies do complexo de *Begomovirus* que infecta tomateiro no Brasil. Correlações altas e significativas ($P < 0,01$) foram encontradas entre os dados de porcentagens de sintomas visuais e de infecção viral,

37 com valores de 0,67 em ambiente protegido e de 0,60 em campo. Baseado no
38 comportamento diferenciado das subamostras, a baixa incidência de begomovírus e
39 reduzidos níveis de infecção viral, em ambas as condições experimentais, concluiu-
40 se que em condições de ambiente protegido destacaram-se as subamostras BGH-
41 2144, BGH-2150, BGH-6878 e BGH-6881. Já em condições de campo com infecção
42 natural, os melhores resultados foram obtidos pelas subamostras BGH-2080 e BGH-
43 6881. Somente o BGH-6881 (*S. peruvianum*) sobressaiu em ambas as condições,
44 com essa resposta sendo atribuída a presença dos alelos dos genes de resistência *Ty-2*
45 e *Ty-3*. Em geral todas as subamostras selecionadas em ambas as condições
46 experimentais podem servir como base para a produção de cultivares mais tolerantes
47 a begomovírus bissegmentados presentes no Brasil, principalmente por serem a
48 maioria delas membros da espécie *S. lycopersicum*.

49 **Palavras-chave adicionais:** begomovírus, variabilidade genética, germoplasma,
50 *Solanum lycopersicum*, *Solanum peruvianum*, genes de resistência *Ty-2* e *Ty-3*.

51

52

ABSTRACT

53 The begomoviruses has gained economic importance in tomato in Brazil since
54 the introduction of a new biotype of whitefly, biotype B; becoming increasingly
55 frequent in the producing areas. A total of 94 tomato accessions belonging to the
56 Vegetables Germplasm Bank from the Federal University of Viçosa (BGH-UFRV)
57 were evaluated under greenhouse (inoculation of Tomato yellow spot virus
58 (ToYSV)) and field (natural infection) conditions for resistance to bipartite
59 begomoviruses present in Brazil. Visual evaluations of symptoms and viral infection
60 were confirmed by a non-radioactive hybridization method. Analysis of variance and
61 correlations were made between the characteristics. A total of 36 clones were
62 obtained and sequenced in the search for identification of isolates of begomoviruses
63 present in field conditions. As the result of the sequencing, it was possible to identify
64 the *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) in all clones, one of the species from the
65 begomoviruses complex that infects tomato in Brazil. High and significant
66 correlations ($P<0,01$) were found between the percentage of visual symptoms data
67 and viral infection, with values of 0.67 to greenhouse and 0.60 in the field. Based in
68 the different behavior of the accessions, the low incidence of begomoviruses and
69 reduced levels of viral infection in both experimental conditions, it was concluded
70 that under greenhouse, the accessions BGH-2144, BGH-2150, BGH-6878 and BGH-

6881 presented better response. Already under field conditions with natural infection, the best results were obtained for accessions BGH-2080 and BGH-6881. Only BGH-6881 (*S. peruvianum*) showed strong resistance in both conditions, which is attributed to the presence of alleles of the genes for resistance *Ty*-2 and *Ty*-3. In general, all the accessions selected in both experimental conditions can be used as basis to obtain tolerant cultivars to bipartite begomoviruses present in Brazil, mainly because most of them are members of the *S. lycopersicum* species.

Keywords: begomoviruses, genetic variability, germplasm, *Solanum lycopersicum*, resistance source, resistance genes *Ty*-2 and *Ty*-3.

INTRODUÇÃO

A família *Geminiviridae* é dividida em quatro gêneros (*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocovirus* e *Begomovirus*) de acordo com o tipo de inseto vetor, planta hospedeira, organização do genoma e filogenia (Stanley et al. 2005). Os geminivírus são vírus de plantas com genoma de DNA circular de fita simples e encapsidados em partículas icosaédricas geminadas (Rojas et al. 2005). Os vírus classificados dentro do gênero *Begomovirus* são transmitidos por mosca-branca (*Bemisia tabaci* - Homoptera: Aleyrodidae) e infectam plantas dicotiledôneas podendo ter um ou dois componentes genômicos.

Nos últimos anos, problemas fitossanitários associados a insetos do gênero *Bemisia* têm se tornado cada vez mais frequentes em tomateiros cultivados em todo o mundo (Morales and Jones 2004; Naranjo and Ellsworth 2001). Em decorrência do aumento populacional da mosca-branca, tem ocorrido aumento na incidência de begomovirose ocasionadas pela transmissão natural por esses insetos, tornando-se um dos principais problemas na cultura do tomateiro no Brasil (Lima et al. 2001; Lourenção et al. 2004; Lourenção and Nagai 1994; Santos et al. 2003; Santos et al. 2004; Villas-Bôas et al. 2002; França et al. 1996; Rezende et al. 1996; Ribeiro et al. 1994).

Os begomovírus ganharam importância econômica em tomateiro no Brasil a partir da introdução de um novo biótipo de mosca-branca, biótipo B (Melo 1992). Quando comparado com o biótipo A, este novo biótipo possui uma maior gama de espécies hospedeiras, o que tem propiciado sua rápida disseminação no Brasil (Bedford et al. 1994; Lourenção and Nagai 1994; Santos et al. 2003; Villas-Bôas et al. 2002). Santos et al. (2003) demonstraram que a interação vírus-vetor pode ser

estabelecida desde a fase inicial do desenvolvimento do inseto, o que pode ser considerado relevante para os estudos epidemiológicos dos begomovírus associados ao biótipo B de *B. tabaci* no Brasil, e torna o controle da mosca-branca ainda mais importante. Desde o início da década de 1990, dezesseis espécies de begomovírus já foram descritas infectando o tomateiro no Brasil, algumas delas estão presentes em várias regiões do país enquanto outras são restritas a determinadas regiões (Ambrozevicius et al. 2000; Ambrozevicius et al. 2002; Andrade et al. 2002; Andrade et al. 2006; ; Bezerra et al. 1997; Castillo-Urquiza et al. 2008; Faria et al. 2000; Faria et al. 1997; Fernandes et al. 2006; Ribeiro et al. 2003)

Mediante estudos de distribuição e diversidade genética de begomovírus no sudeste do país foram caracterizadas três novas espécies: o *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), presente no Triângulo Mineiro (Fernandes et al. 2006) e duas espécies descritas na Zona Metalúrgica de Minas Gerais, o *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) e o *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) (Ambrozevicius et al. 2002). O ToYSV, além de infectar o tomateiro e induzir sintomas severos, infecta espécies de plantas invasoras como *Macroptilium* e *Sida* (Andrade et al. 2006). O ToYSV tem sido caracterizado molecularmente (Andrade et al. 2006) e vem sendo empregado como begomovírus modelo na procura de fontes de resistência por Aguilera et al. 2008 e Aguilera et al. 2011b, principalmente por ser uns dos begomovírus que ocasiona os sintomas mais severos e com maior precocidade se comparado com outras espécies descritas no Brasil (Andrade et al. 2006).

O uso de cultivares resistentes é o método mais promissor de controle dessas viroses, comparado ao controle de plantas daninhas, utilização de mudas livres de vírus, controle da mosca-branca e período livre de tomateiro no campo (Freitas-Astúa et al. 2002; Zerbini et al. 2007). Numerosos trabalhos foram desenvolvidos no Brasil (Aguilera et al. 2008; Aguilera et al. 2011a; Aguilera et al. 2011b; Ferraz et al. 2003; Giordano et al. 1999; Lourenção et al. 2004; Matos et al. 2003) e no mundo (Pico et al. 1999; Pico et al. 2001; Piven et al. 1995; Tripathi and Varma 2003; Zakay et al. 1991) com o objetivo de obter fontes de resistência a begomovírus em espécies do gênero *Solanum*, principalmente ao *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) que é o begomovírus mais agressivo para a cultura do tomate nas regiões onde ocorre, sendo considerada praga quarentenária para o Brasil.

Os bancos de germoplasma constituem uma importante forma de conservação de recursos genéticos, e neles podem ser encontradas possíveis fontes de resistência

139 a pragas e doenças, que podem ser incorporadas a cultivares comerciais por meio de
140 programas de melhoramento (Silva et al. 2001). Subamostras de *S. lycopersicum*
141 conservadas no Banco de Germoplasma de Hortaliças da UFV (BGH-UFV) têm sido
142 utilizadas de forma sistemática na busca de fontes de resistência a pragas e doenças
143 (Silva, 2001), das quais foram identificadas até o momento seis fontes de resistência
144 para: *Tuta absoluta* (Suinaga et al. 2003; Oliveira et al. 2009), *Peper yellow mosaic*
145 *virus* (PepYMV) (Juhász et al. 2006), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) (Moura
146 et al. 2005), *Bemisia tabaci* biotipo B (Fernandes et al. 2009), *Phytophthora*
147 *infestans* (Abreu et al. 2008) e *Tomato yellow spot virus*, (ToYSV) (Aguilera et al.
148 2008; Aguilera et al. 2011a; Aguilera et al. 2011b).

149 O presente trabalho teve como objetivo identificar possíveis fontes de
150 resistência a begomovírus dentre 94 subamostras de tomateiro (*Solanum* spp. seção
151 *Lycopersicum*) pertencentes ao Banco de Germoplasma de Hortaliças da UFV em
152 condições de inoculação artificial e natural.

153 MATERIAL E MÉTODOS

154 *Condições Experimentais*

155 Os experimentos foram conduzidos em ambiente protegido no Departamento
156 de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), e no campo em áreas
157 experimentais da Horta de Pesquisa da UFV localizadas na Região da Zona da Mata
158 de Minas Gerais, a latitude 20° 45' 14" S, longitude 42° 52' 53" W e altitude de
159 648.74 m. Foram avaliadas 94 subamostras de tomate (Tabela 1), as quais fazem
160 parte da coleção de germoplasma do Banco de Germoplasma de Hortaliças (BGH)
161 da UFV (www.bgh.ufv.br), conjuntamente com três controles: a cultivar 'Santa
162 Clara' e o híbrido 'Débora Plus' suscetíveis a begomovírus e o híbrido 'Fany' como
163 controle tolerante.

164 *Avaliações em ambiente protegido*

165 Inoculação artificial foi realizada em plântulas no estágio de dois pares de
166 folhas verdadeiras, com 2µg de cada componente genômico do begomovírus *Tomato*
167 *yellow spot virus* (ToYSV) (Aragão et al. 1996).

168 **Tabela 1.** Códigos, espécies e origem das subamostras de tomate empregadas neste estudo.

No.	Código	Especie	Origen*	No.	Código	Especie	Origen*	No.	Código	Especie	Origen*
1	BGH-2062	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	34	BGH-2111	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	67	BGH-6858	<i>S. lycopersicum</i>	MG-P
2	BGH-2064	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	35	BGH-2112	<i>S. lycopersicum</i>	-	68	BGH-6859	<i>S. lycopersicum</i>	MG-P
3	BGH-2065	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	36	BGH-2113	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	69	BGH-6861	<i>S. lycopersicum</i>	R-IT
4	BGH-2068	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	37	BGH-2114	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	70	BGH-6866	<i>S. lycopersicum</i>	-
5	BGH-2069	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	38	BGH-2115	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	71	BGH-6867	<i>S. lycopersicum</i>	PI
6	BGH-2071	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	39	BGH-2116	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	72	BGH-6877	<i>S. lycopersicum</i>	-
7	BGH-2072	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	40	BGH-2117	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	73	BGH-6878	<i>S. lycopersicum</i>	-
8	BGH-2073	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	41	BGH-2118	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	74	BGH-6880	<i>S. lycopersicum</i>	-
9	BGH-2074	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	42	BGH-2120	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	75	BGH-6881	<i>S. peruvianum</i>	-
10	BGH-2075	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	43	BGH-2121	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	76	BGH-6884	<i>S. lycopersicum</i>	-
11	BGH-2076	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	44	BGH-2122	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	77	BGH-6887	<i>S. lycopersicum</i>	-
12	BGH-2077	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	45	BGH-2123	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	78	BGH-6897	<i>S. lycopersicum</i>	-
13	BGH-2078	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	46	BGH-2124	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	79	BGH-6901	<i>S. habrochaites</i>	-
14	BGH-2080	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	47	BGH-2125	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	80	BGH-6924	<i>S. lycopersicum</i>	UC-EUA
15	BGH-2081	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	48	BGH-2127	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	81	BGH-6925	<i>S. lycopersicum</i>	UC-EUA
16	BGH-2082	<i>S. lycopersicum</i>	-	49	BGH-2128	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	82	BGH-6926	<i>S. lycopersicum</i>	UC-EUA
17	BGH-2083	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	50	BGH-2129	<i>S. lycopersicum</i>	-	83	BGH-6993	<i>silv.</i>	-
18	BGH-2086	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	51	BGH-2130	<i>S. lycopersicum</i>	-	84	BGH-7024	<i>S. lycopersicum</i>	PAL-BR
19	BGH-2087	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	52	BGH-2131	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	85	BGH-7192	<i>S. lycopersicum</i>	-
20	BGH-2088	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	53	BGH-2132	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	86	BGH-7193	<i>S. lycopersicum</i>	ES-BR
21	BGH-2089	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	54	BGH-2133	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	87	BGH-7197	<i>S. lycopersicum</i>	PA-BR
22	BGH-2091	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	55	BGH-2134	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	88	BGH-7213	<i>S. lycopersicum</i>	WV- EUA
23	BGH-2092	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	56	BGH-2135	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	89	BGH-7218	<i>S. lycopersicum</i>	JÁ
24	BGH-2093	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	57	BGH-2138	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	90	BGH-7221	<i>S. lycopersicum</i>	-

Tabela 1. (cont.)

25	BGH-2095	<i>S. lycopersicum</i>	-	58	BGH-2141	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	91	BGH-7222	<i>S. lycopersicum</i>	ES-BR
26	BGH-2096	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	59	BGH-2143	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	92	BGH-7263	<i>S. lycopersicum</i>	LP-BO
27	BGH-2097	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	60	BGH-2144	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	93	BGH-7267	<i>S. lycopersicum</i>	EUA
28	BGH-2098	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	61	BGH-2145	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	94	BGH-7466	<i>S. lycopersicum</i>	-
29	BGH-2100	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	62	BGH-2146	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	Débora		<i>S. lycopersicum</i>	Sakata Seed
30	BGH-2102	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	63	BGH-2149	<i>S. lycopersicum</i>	-	Fanny		<i>S. lycopersicum</i>	Seminis
31	BGH-2105	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	64	BGH-2150	<i>S. lycopersicum</i>	-	Santa Clara		<i>S. lycopersicum</i>	Sakata Seed
32	BGH-2109	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	65	BGH-2151	<i>S. lycopersicum</i>	-				
33	BGH-2110	<i>S. lycopersicum</i>	UP-EUA	66	BGH-2152	<i>S. lycopersicum</i>	-				

*origem registrado no livro de registro do banco disponível no www.bgh.ufv.br, o traço (-) representa a origem desconhecida. Emcapa, Santo Antonio- Piauí (PI); Isla-Porto Alegre (I-PAL); Japão (JA); La Paz-Bolívia (LP-BO); Maracaçumé-Paraná (M-PA); Paracatu-Minas Gerais (P-MG); Roma- Itália (R-IT); Universidade da Califórnia-Devis (UC-EUA); Universidade de Purdue (UP-EUA); Venda Nova dos Emigrantes - Espírito Santo (VN-ES); Vitória-Espírito Santo (V-ES); West Lafayette (University of Purdue) – Indiana (UP-EUA); West Virgínia (WV-EUA).

173 Foi utilizado o isolado Bi2 do ToYSV obtido por Ambrozevicius et al.
174 (Ambrozevicius et al. 2002). Para a inoculação via biobalística foram utilizados os
175 clones infecciosos pToYSV-A1.2 e pToYSV-B1.2, descritos por Andrade et al.
176 (Andrade et al. 2006). Depois de inoculadas, as plantas foram mantidas em recipientes
177 de um litro contendo substrato composto de mistura de terra e esterco bovino na
178 proporção 3:1, previamente esterilizado. Cada parcela foi constituída por uma planta
179 em cada recipiente, totalizando cinco plantas por subamostra inoculadas com o
180 begomovírus ToYSV e uma planta bombardeada com água como controle negativo. As
181 plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperaturas médias diárias de
182 $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ e conduzidas em delineamento inteiramente casualizado. O manejo das
183 plantas em ambiente protegido incluiu irrigações diárias dependendo da necessidade
184 da cultura e das condições climáticas, eliminação semanal das brotações excedentes
185 conduzindo as plantas com uma única haste e tutorado com fitilho. As avaliações
186 foram realizadas aos 15, 30 e 45 dias após inoculação (DAI).

187

188 ***Avaliações em campo***

189 O experimento foi conduzido com o mesmo número de subamostras e controles
190 utilizados nas avaliações em ambiente protegido. As mudas foram transplantadas com
191 quatro a cinco folhas definitivas (cerca de 10 cm de altura), no espaçamento de 1,25 m
192 entre linhas e 0,6 m entre plantas. Foram realizadas adubações segundo
193 recomendações da Comissão de Fertilidade de Solo do Estado de Minas Gerais
194 (Ribeiro et al. 1999). As plantas foram conduzidas com uma haste e tutoradas
195 verticalmente com fitilho, e irrigadas por sistema de gotejamento realizando
196 fertirrigações semanais.

197 O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados com três
198 repetições. Em cada repetição (parcela) cada subamostra foi representada por cinco
199 plantas, sendo empregadas as três plantas do meio de cada parcela para realização das
200 diferentes avaliações aos 60 dias após o transplântio (DAT). Não foi realizado controle
201 do inseto vetor, entretanto, foi feito o controle de outras doenças que por ventura
202 acometeram as plantas.

203

204 ***Caracterização dos sintomas visuais***

205 A presença ou ausência de sintomas de begomovírus foi avaliada de forma
206 visual nas duas condições experimentais, classificando-se a planta como suscetível

207 sempre que observado pelo menos um dos sintomas característicos de infecção por
208 begomovírus, como mosaico severo, epinastia, manchas cloróticas e encarquilhamento
209 foliar. Utilizou-se uma escala de notas que variou de 1 a 3 adaptada de Lourenção et al
210 (2004), onde 1 – ausência de sintomas; 2 – pequenas manchas amarelas, mosaico leve
211 e epinastia; 3 – manchas amarelas, mosaico severo, epinastia, distorção foliar e
212 redução do crescimento (Figura 1). Ao final das avaliações foi quantificada em cada
213 subamostra a porcentagem de plantas com sintomas visuais do total de plantas
214 inoculadas em ambiente protegido e do total de plantas amostradas no campo.



215
216 **Figura 1.** Escala de classificação visual empregada para avaliar o efeito da inoculação
217 das subamostras de tomate em condições de ambiente protegido e de campo. O
218 padrão empregado foi de folhas da cultivar Santa Clara: plantas sem sintomas
219 (1); pequenas manchas amarelas, mosaico leve e epinastia (2); manchas
220 amarelas, mosaico severo, epinastia, distorção foliar e redução do crescimento
221 (3).

222

223 ***Extração do DNA e confirmação da infecção viral por meio de hibridização*** 224 ***molecular***

225 O DNA total das plantas inoculadas foi extraído de acordo com Dellaporta et al.
226 (1983) e empregadas alíquotas iguais de cada amostra (50µl) para ser desnaturado e
227 logo fixado com luz ultravioleta 120mJ/cm² em membranas de náilon (Hybond-N⁺,
228 GE Healthcare). Empregou-se como controle positivo DNA de amostras de tomate da
229 cultivar Moneymaker infectados com begomovírus e como controles negativos foram
230 empregados DNA de amostras de tomate não infectado da mesma cultivar e água
231 milli-q. Os três controles foram empregados em todas as membranas obtidas. Foi
232 quantificada em cada subamostra a porcentagem de plantas com infecção viral do total
233 de plantas inoculadas em ambiente protegido e do total de plantas amostradas no

234 campo.

235 As membranas do experimento de ambiente protegido foram submetidas à
236 hibridização com sonda específica para detecção do ToYSV, correspondente a um
237 fragmento de DNA-A liberado a partir da digestão do clone pToYSV-A 1.2 com a
238 enzima *Pst* I (Andrade, 2006). As membranas do experimento de campo foram
239 submetidas à hibridização com sonda inespecífica para detecção correspondente aos
240 fragmentos dos DNA-As dos begomovírus ToYSV, ToRMV (*Tomato rugose mosaic*
241 *virus*) e ToSRV (*Tomato severe rugose virus*) à partir da digestão com *Pst* I (clone
242 pToYSV-A 1.2) e *EcoR* I (clones ToRMV-[Ube1]-A e PVIR096-ToSRV-A (Fernandes,
243 2006 e (Lima 2008), respectivamente).

244 A hibridização não radioativa foi realizada empregando o *Kit Dig High Primer*
245 *DNA Labeling and Detection Starter kit II* (Roche Applied Sciences), adotando-se
246 condições de lavagem segundo a especificidade dos experimentos.

247 A hibridização em condições de alta especificidade (ambiente protegido) foi
248 realizada a 50°C por 16 horas, seguida de duas lavagens a temperatura ambiente em
249 0,5X SSC e SDS 0.1% por 5 minutos cada uma e outras duas lavagens a 65°C em 0,1X
250 SSC e SDS 0.1% por 15 minutos cada uma.

251 A hibridização em condições de baixa especificidade (campo) foi realizada a
252 50°C por 16 horas, seguida de duas lavagens a temperatura ambiente em 2X SSC e
253 SDS 0.1% por 5 minutos cada uma e outras duas lavagens a 65°C em 0,5X SSC e SDS
254 0.1% por 15 minutos cada uma. Depois de realizado o processo de hibridização as
255 membranas foram expostas a filmes de raios X (Kodak X-OMAT) por 20 minutos e
256 posterior revelação.

257

258 ***Identificação das espécies virais presentes no campo***

259 Para a identificação das espécies virais presente nas amostras tomate coletadas a
260 partir do experimento de campo, foram selecionadas 65 amostras onde foi confirmada
261 a presença de begomovírus pelo teste de hibridização. O DNA das amostras
262 selecionadas foi extraído segundo Dellaporta et al. (1983) e empregado em reações de
263 RCA (*rolling circle amplification*) segundo Inoue-Nagata et al. (2004), clonado em
264 pBLUESCRIPT KS+ (Stratagene) depois da monomerização com a enzima de
265 restrição *Bam* HI. O sequenciamento dos clones obtidos foi realizado pela Macrogen
266 Inc. Para determinar as possíveis espécies de begomovírus foi empregado o critério de
267 89 % de identidade da sequência de nucleotídeos do DNA-A completo estabelecido

268 pelo *Geminiviridae Study Group* do ICTV (Fauquet et al. 2008). As sequências obtidas
269 foram submetidas ao BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e comparações
270 par-a-par para designação das espécies.

271

272 ***Análise estatística***

273 Foi realizada análise de variância conjunta pelo teste “F” para cada condição
274 experimental (ambiente protegido e campo), sendo as médias comparadas pelo teste de
275 Skott & Knot (1974), ao considerar as notas atribuídas às avaliações visuais.
276 Coeficientes de correlação de Pearson (ρ) foram estimados entre os diferentes
277 caracteres relacionados à resistência (porcentagem de plantas sintomáticas e
278 porcentagem de plantas com infecção viral), testados pelo teste “t” a 1 e 5 % de
279 probabilidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o aplicativo
280 GENES (Cruz 2006).

281

282

RESULTADOS

283 A resposta à infecção por begomovírus bissegmentados presentes no Brasil em
284 subamostras de tomate pertencentes ao BGH da UFV foi avaliada em condições de
285 ambiente controlado e de campo com inoculação artificial e natural, respectivamente
286 (Figura 2 e Tabela 2). De acordo com a análise de variância, todos os caracteres foram
287 significativos em diferenciar as subamostras (dados não mostrados). Os dados foram
288 analisados em separado para cada condição experimental pelo fato de os experimentos
289 terem sido conduzidos em diferentes delineamentos o que impediu a realização de uma
290 análise conjunta dos dados. Os coeficientes de variação fenotípicas, que são
291 indicativos da precisão experimental, revelaram valores superiores a 30 %, o que
292 evidencia a alta dispersão e heterogeneidade dos dados obtidos em ambas as condições
293 experimentais, influenciados pela alta variabilidade das respostas das 94 subamostras e
294 as três testemunhas avaliadas após a inoculação artificial e natural de begomovírus
295 bissegmentados (dados não amostrados).

296

297 ***Respostas obtidas em ambiente protegido***

298 Após a inoculação com o ToYSV o comportamento das 94 subamostras e as três
299 testemunhas foi avaliado através da quantificação de três variáveis: porcentagem de
300 plantas com sintomas visuais do total de plantas avaliadas, porcentagem de plantas
301 com infecção viral do total de plantas avaliadas e notas atribuídas aos sintomas visuais

302 para estimar a severidade da infecção em diferentes datas de avaliação (Tabela 2).

303 Diferenças altamente significativas ($P < 0,01$) foram obtidas para a variável nota
304 de sintomas visuais mostrando a alta diversidade das respostas das subamostras
305 avaliadas quando comparadas entre elas e com os controles empregados.

306 Na Figura 2A, é apresentada as distribuições das frequências que resumem o
307 comportamento das subamostras em ambiente protegido na ultima data de avaliação
308 (45 DAI) para as três variáveis estimadas. Nestas condições de inoculação a resposta
309 das subamostras foi caracterizada pela ampla susceptibilidade ao ToYSV. Somente seis
310 subamostras (BGH-2129, BGH-2144, BGH-2150, BGH-6878, BGH-6881 e BGH-
311 7197 que representam apenas 6,19 % do total testado) não manifestaram sintomas
312 visuais resultando em um comportamento promissor, visto que ToYSV apresenta
313 grande precocidade e intensidade de sintomas. Em três subamostras (BGH-2087,
314 BGH-2095 e BGH-7221) apenas 20% das plantas inoculadas apresentaram sintomas, o
315 que evidencia a possibilidades de seleção de materiais promissores para tolerância ao
316 ToYSV.

317 Com o teste de hibridização não radioativa foi confirmada a ampla
318 suscetibilidade das subamostras, onde foi observada uma correlação altamente
319 significativa de 0,67 entre plantas infectadas e apresentando sintomas visuais (Tabela
320 2). Quando considerada a distribuição das frequências da infecção viral (Figura 2A)
321 observa-se que somente duas subamostras (BGH-2150 (*S. lycopersicum*) e BGH-6901
322 (*S. habrochaites*) que representam 2,06 % do total de subamostras avaliadas) tiveram
323 ausência total de infecção, porém na subamostra BGH-6901 foi observado sintomas
324 em 40 % do total de plantas inoculadas e uma nota media de sintomas visuais de 1,4
325 (Tabela 2, Figura 2A). O restante das subamostras manifestaram infecção viral entre
326 20 e 100 % do total de plantas inoculadas (Figura 2A).

327 Na Tabela 2 são mostrados os códigos das subamostras avaliadas em ambiente
328 protegido ante a inoculação artificial por begomovírus, conjuntamente com o resultado
329 das comparações das médias da variável avaliação visual expressadas em valores
330 médios das notas comparadas pelo teste de Skott & Knot (1974) a 5 % de
331 probabilidade, além da incidência da infecção viral e dos sintomas visuais expressadas
332 em porcentagem. Em todas as comparações o teste de Skott & Knot acusou diferenças
333 significativas entre as subamostras, dividindo-as em dois grandes grupos de acordo
334 com a variável analisada.

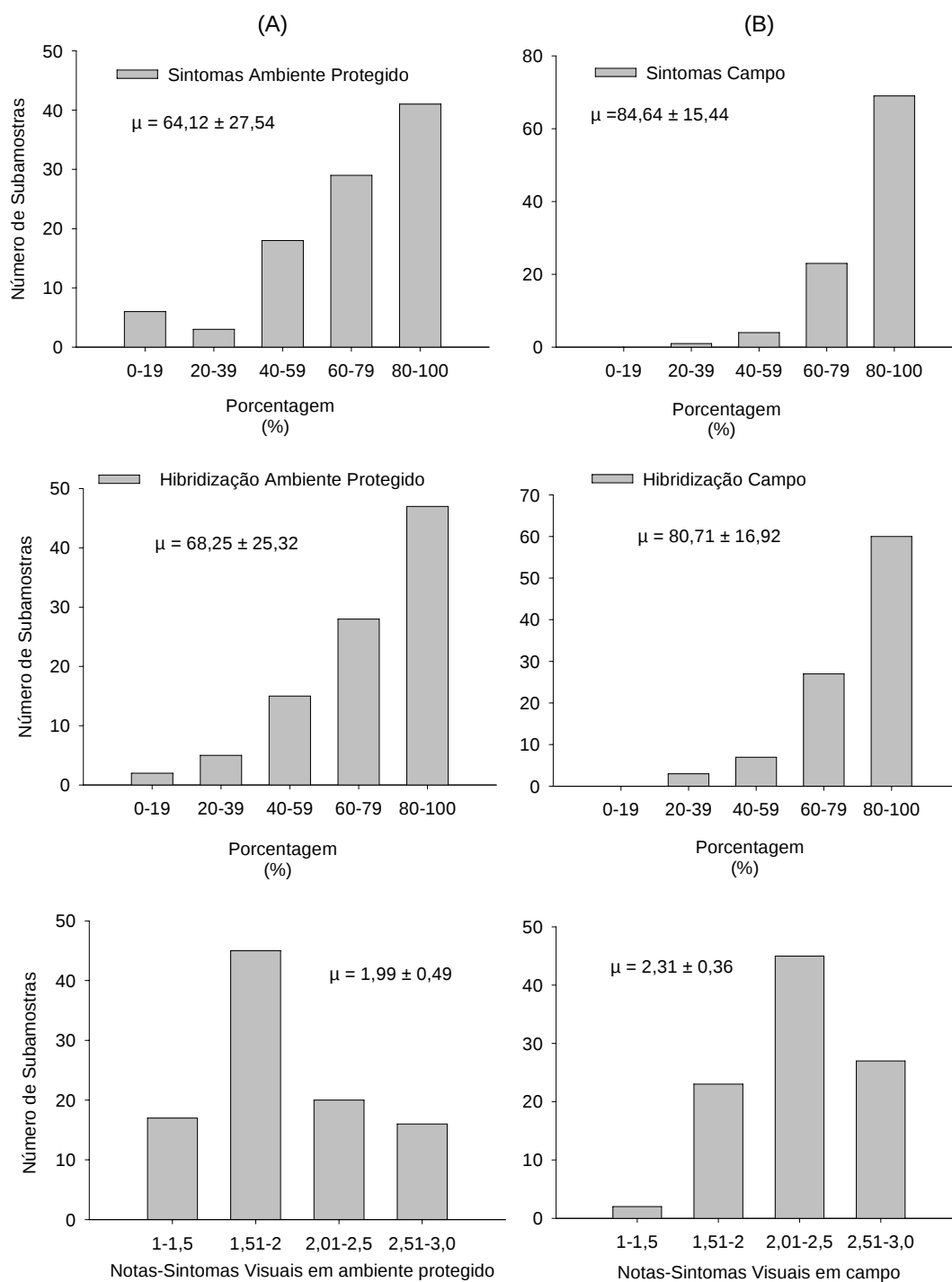


Figura 1. Distribuição das frequências ao considerar a porcentagem de plantas com sintomas, porcentagem de plantas com infecção viral e as notas atribuídas as avaliações dos sintomas visuais, relacionadas à resistência a begomovírus em condições de ambiente protegido (A) e de campo (B) em 94 subamostras de tomate e variedades comerciais pertencentes à coleção do BGH - UFV, Minas Gerais.

343 Os controles empregados que constituem cultivos amplamente disseminados no
344 Brasil, manifestaram notas de sintomas visuais, porcentagem de plantas com sintomas
345 visuais e infecção viral esperadas, sendo a cultivar Santa Clara e o híbrido Débora os
346 mais suscetíveis. Já o híbrido Fany, portador dos alelos do gene de resistência *Ty-1*,
347 nessas mesmas condições de inoculação mostrou-se tolerante ao ToYSV com notas
348 médias de 1,4 e baixas porcentagens de sintomas visuais e de infecção viral (Tabela
349 2).

350 Ao considerar as três variáveis analisadas como respostas das subamostras à i-
351 noculação por ToYSV, podemos observar que um grande número de subamostras fo-
352 ram suscetíveis e algumas apresentaram-se tolerantes (Tabela 2), o que evidenciou a
353 ampla diversidade das respostas obtidas nas subamostras avaliadas. Destacaram-se as
354 subamostras BGH-2144, BGH-2150, BGH-6878, BGH-6881 e BGH-6901. Destas su-
355 bamostras as três primeiras são da espécie *S. lycopersicum*, a quarta da espécie *S. pe-*
356 *ruvianum* e a quinta da espécie *S. habrochaites*. Nove subamostras (BGH-2062, BGH-
357 2127, BGH-6858, BGH-6867, BGH-7263, BGH-2075, BGH-2109, BGH-2125 e
358 BGH-2132) exibiram excelentes padrões de suscetibilidade ao ToYSV por apresenta-
359 rem, em 100% das plantas avaliadas, notas de sintomas (2,8 a 3,0) com valores muito
360 superiores aos das testemunhas suscetíveis empregadas (Tabela 2).

361

362 **Respostas obtidas em campo**

363 Em condições de campo as amostras foram avaliadas quanto à resistência a
364 begomovírus que ocorrem em Viçosa, Minas Gerais, por meio de inoculação natural
365 pelo inseto vetor. O local escolhido para o teste de inoculação natural tem sido
366 utilizado para condução de experimentos com tomate e outras hortaliças.

367 Após amostragem aos 60 DAT foram selecionadas 65 amostras para determinar
368 as possíveis espécies de begomovírus distribuídas neste local. Os resultados do
369 sequenciamento das amostras de campo mostraram a presença da espécie *Tomato*
370 *severe rugose virus* (ToSRV). A identidade da sequência completa do DNA-A dos 36
371 clones sequenciados variou de 96 a 99% (dados não mostrados) comparando-se com o
372 isolado ToSRV (número de acesso no GenBank: DQ207749) um dos vírus já descritos
373 no complexo de begomovírus que infectam tomate no Brasil.

374 **Tabela 2.** Comparações de médias por Skott Knot a 5 % de probabilidade entre 94 subamostras de tomate do BGH-UFV relacionados à resistência a
375 begomovírus em condições de ambiente protegido e de campo, ao considerar as variáveis incidência da doença visual, incidência da infecção viral
376 e médias das notas atribuídas as avaliações visuais.

AMBIENTE PROTEGIDO ^a								CAMPO ^b								
Código*	Incidência		Visual ³ (notas)	Incidência		Visual (notas)		Código	Incidência		Visual (notas)		Incidência		Visual. (notas)	
	Visual ¹	Infecção ²		Visual	Infecção				Visual	Infecção			Visual	Infecção		
	------(%)-----			------(%)-----					------(%)-----				------(%)-----			
BGH-2062	100	100	3.0 A	83	83	2,50 A		BGH-2143	80	60	2.0 B		80	90	1,83 B	
BGH-2127	100	100	3.0 A	90	90	2,09 B		BGH-6887	80	80	2.0 B		100	100	2,80 A	
BGH-6858	100	100	3.0 A	100	57	2,29 B		BGH-6926	100	100	2.0 B		90	100	2,20 B	
BGH-6867	100	100	3.0 A	100	100	2,71 A		BGH-7192	60	60	2.0 B		100	100	2,80 A	
BGH-7263	100	100	3.0 A	100	100	2,40 A		BGH-7193	100	100	2.0 B		100	90	2,40 A	
BGH-2075	100	100	2.8 A	100	100	2,83 A		BGH-2068	40	40	1.8 B		100	100	2,67 A	
BGH-2109	100	80	2.8 A	82	64	1,91 B		BGH-2071	40	60	1.8 B		100	100	2,50 A	
BGH-2125	100	100	2.8 A	70	70	1,82 B		BGH-2072	40	60	1.8 B		100	50	2,17 B	
BGH-2132	100	100	2.8 A	100	82	2,00 B		BGH-2076	40	40	1.8 B		83	83	2,67 A	
BGH-2069	80	100	2.6 A	100	67	2,33 A		BGH-2080	40	40	1.8 B		33	33	1,50 B	
BGH-2114	100	60	2.6 A	82	82	2,27 B		BGH-2081	40	60	1.8 B		83	83	2,50 A	
BGH-2116	100	100	2.6 A	80	70	2,10 B		BGH-2089	60	60	1.8 B		100	60	2,40 A	
BGH-2120	100	80	2.6 A	91	91	2,64 A		BGH-2092	60	40	1.8 B		100	80	2,00 B	
BGH-6909	100	80	2.6 A	80	100	2,60 A		BGH-2097	60	60	1.8 B		100	100	3,00 A	
BGH-6993	80	80	2.6 A	89	100	2,67 A		BGH-2100	60	80	1.8 B		100	60	2,20 B	
BGH-7222	80	80	2.6 A	100	89	3,00 A		BGH-2105	60	60	1.8 B		64	45	1,73 B	
BGH-2074	80	60	2.4 A	83	67	2,33 A		BGH-2111	80	80	1.8 B		82	91	1,91 B	
BGH-2110	80	100	2.4 A	55	82	2,09 B		BGH-2113	80	60	1.8 B		80	60	2,10 B	
BGH-2121	80	100	2.4 A	73	100	1,64 B		BGH-2118	60	80	1.8 B		91	82	1,91 B	
BGH-2141	80	100	2.4 A	83	83	2,33 A		BGH-2134	60	60	1.8 B		79	79	2,35 A	
BGH-6925	100	100	2.4 A	100	100	2,80 A		BGH-2149	60	60	1.8 B		68	79	2,43 A	
BGH-7267	100	80	2.4 A	100	100	2,78 A		BGH-6897	60	60	1.8 B		67	67	2,00 B	
BGH-2064	60	80	2.2 A	67	83	2,17 B		BGH-7024	40	40	1.8 B		89	89	2,00 B	
BGH-2065	60	40	2.2 A	67	67	2,00 B		BGH-7218	60	60	1.8 B		100	90	2,60 A	

BGH-2083	60	80	2.2	A	83	67	2,00	B	S. Clara	60	80	1.8	B	100	95	2,81	A
BGH-2088	60	80	2.2	A	100	80	2,40	A	BGH-2078	40	40	1.6	B	67	83	1,67	B
BGH-2115	80	100	2.2	A	73	91	2,18	B	BGH-2082	40	40	1.6	B	100	50	2,17	B
BGH-2122	100	100	2.2	A	64	73	2,55	A	BGH-2123	60	20	1.6	B	100	73	2,94	A
BGH-2131	100	60	2.2	A	72	83	1,89	B	BGH-2145	60	80	1.6	B	84	79	2,35	A
BGH-2133	80	100	2.2	A	61	78	2,15	B	BGH-2151	60	40	1.6	B	72	72	2,33	A
BGH-2138	80	100	2.2	A	83	83	2,50	A	BGH-6861	40	60	1.6	B	100	100	2,50	A
BGH-2152	100	80	2.2	A	80	80	1,93	B	BGH-6877	40	80	1.6	B	100	100	2,50	A
BGH-6859	80	100	2.2	A	90	100	2,70	A	BGH-2087	20	80	1.4	B	80	80	2,40	A
BGH-6866	80	80	2.2	A	100	89	2,33	A	BGH-2095	20	80	1.4	B	100	100	3,00	A
BGH-6924	60	60	2.2	A	90	100	2,80	A	BGH-2112	40	40	1.4	B	64	73	2,27	B
BGH-7213	60	60	2.2	A	100	100	2,75	A	BGH-6880	40	40	1.4	B	100	90	2,40	A
BGH-2073	60	60	2.0	B	67	50	2,00	B	BGH-6884	40	40	1.4	B	89	89	2,33	A
BGH-2077	60	60	2.0	B	67	67	2,17	B	BGH-6901	40	0	1.4	B	80	60	2,30	B
BGH-2086	60	60	2.0	B	50	50	1,50	B	BGH-7466	40	40	1.4	B	86	71	2,57	A
BGH-2091	60	60	2.0	B	100	100	2,80	A	Débora	40	60	1.4	B	92	96	2,63	A
BGH-2093	60	80	2.0	B	100	80	2,80	A	Fany	40	40	1.4	B	43	38	1,57	B
BGH-2096	60	40	2.0	B	100	100	2,00	B	BGH-7221	20	20	1.2	B	90	100	2,70	A
BGH-2098	60	60	2.0	B	100	100	2,40	A	BGH-2129	0	80	1.0	B	72	67	2,16	B
BGH-2102	60	60	2.0	B	100	80	2,00	B	BGH-2144	0	20	1.0	B	89	78	2,17	B
BGH-2117	80	80	2.0	B	64	50	2,09	B	BGH-2150	0	0	1.0	B	64	79	2,29	B
BGH-2124	80	60	2.0	B	73	82	2,27	B	BGH-6878	0	20	1.0	B	70	60	1,90	B
BGH-2128	80	100	2.0	B	70	70	2,27	B	BGH-6881	0	20	1.0	B	50	38	1,75	B
BGH-2130	100	100	2.0	B	81	81	2,00	B	BGH-7197	0	100	1.0	B	100	100	2,90	A
BGH-2135	80	60	2.0	B	86	86	2,14	B									

Correlação	0,67 **	0,60 **	Correlação	0,67 **	0,60 **
------------	---------	---------	------------	---------	---------

377 * dado de passaporte no BGH-UFV disponíveis em www.bgh.ufv.br; ^a inoculação pelo método de bombardeamento com o *Tomato yellow spot virus* (ToYSV); ^b infecção
378 natural a partir do inseto vetor (mosca-branca) onde foi confirmada a presença do *Tomato severe rugose virus* (ToSRV); ¹ porcentagem de plantas com sintomas do total
379 de plantas inoculadas; ² porcentagem de plantas com infecção viral (confirmado por hibridização) do total de plantas inoculadas ³ valores médios das notas atribuídas
380 aos sintomas de begomovírus (plantas sem sintomas (1); pequenas manchas amarelas, mosaico leve e epinastia (2); manchas amarelas, mosaico severo, epinastia, distor-
381 ção foliar e redução do crescimento (3)).

382 Em campo os controles empregados manifestaram notas de sintomas,
383 porcentagem de plantas com sintomas e infecção viral esperados, sendo a cultivar
384 Santa Clara e o híbrido Débora os mais suscetíveis, coincidindo com o resultado
385 obtido quando inoculado com o ToYSV, ao manifestarem valores de 2,81 e 2,63 para
386 as notas dos sintomas visuais, respectivamente. Já o híbrido Fany mostrou-se
387 tolerante ao exibir 43 % das plantas com sintomas e delas somente 38 %
388 apresentaram infecção viral, exibindo em média 1,57 de nota de sintomas visuais, o
389 que o consolida como controle tolerante a begomovírus no Brasil (Tabela 2).

390 Diferenças altamente significativa ($P<0,01$) e coeficientes de variação
391 superiores a 30 % foram obtidas para a variável nota de sintomas visuais, mostrando
392 a alta diversidade das respostas das subamostras avaliadas quando comparadas entre
393 elas e com os controles empregados (dados não amostrados). Foi obtida uma
394 correlação altamente significativa de 0,60 entre as porcentagens dos sintomas visuais
395 e de infecção viral (Tabela 2).

396 Quando quantificadas as porcentagens de plantas com sintomas e plantas com
397 infecção viral no experimento de campo e comparadas com o experimento de
398 ambiente protegido (Figura 2A), observa-se maior predominância de sintomas
399 visuais e de detecção de infecção viral em condições de campo, assim como, uma
400 maior distribuição das notas de sintomas nos intervalos de maior severidade (2 a 3).
401 Estes resultados auxiliam na eliminação de falsos positivos durante a seleção dos
402 materiais promissores.

403 Ao observar os dados na Tabela 2 somente as subamostras BGH-2080 e BGH-
404 6881 apresentaram baixos níveis de infecção viral com 33 e 38 % das plantas
405 positivas pela hibridização não radioativa, com desempenho próximo ao do híbrido
406 Fany empregado como controle tolerante.

407 Também foi verificado subamostras que exibiram um padrão de suscetibilidade
408 superior aos controles Santa Clara e Débora. Ao todo 22 subamostras (BGH-2095,
409 BGH-7263, BGH-7213, BGH-2098, BGH-2062, BGH-7267, BGH-6866, BGH-
410 6867, BGH-7197, BGH-2091, BGH-6887, BGH-7221, BGH-7218, BGH-7193,
411 BGH-2123, BGH-6993, BGH-2097, BGH-7192, BGH-6861, BGH-6926, BGH-7222
412 e BGH-6925) apresentaram valores médios das notas visuais que oscilaram entre 2,2
413 e 3,0. Desse total, somente BGH-2062, BGH-6867 e BGH-7263 mostraram-se como
414 materiais altamente suscetíveis em condições de casa de vegetação e de campo.

415

416 ***Seleção de materiais promissores em ambas as condições experimentais***

417 Ao considerar todos os resultados, as subamostras BGH-2080 e BGH-6881
418 poderiam ser recomendadas como materiais promissores para resistência a begomo-
419 vírus a serem empregados em programas de melhoramento por apresentarem bom
420 desempenho em ambas as condições experimentais testadas.

421 A subamostra BGH-2080 da espécie *S. lycopersicum*, em condições de casa de
422 vegetação, teve 40 % de suas plantas manifestando sintomas visuais e infecção viral
423 por ToYSV, com média de notas dos sintomas visuais de 1,8, o que pode ser conside-
424 rado como um comportamento moderado. No entanto, esta mesma subamostra em
425 condições de campo destacou-se pela baixa manifestação de sintomas e infecção vi-
426 ral (33 % das plantas avaliadas), com 1,5 de nota de sintoma visual (Tabela 2). A res-
427 posta diferenciada em ambos os experimentos e o tipo de espécie (*S. lycopersicum*)
428 faz desta subamostra uma fonte promissora de genes de resistência a begomovírus
429 bissegmentados no Brasil.

430 A subamostra BGH-6881 da espécie *S. peruvianum*, em condições de casa de
431 vegetação, não apresentou incidência da doença. Esta resposta pode ser considerada
432 como um comportamento de um material resistente para todas as características ava-
433 liadas. Já em condições de campo esta mesma subamostra manifestou sintomas em
434 50 % das plantas amostradas com nota de sintomas de 1,75, no entanto, com 38 %
435 das plantas positivas ao teste de hibridização aos 60 DAT (Tabela 2).

436

437 **DISCUSSÃO**

438 São grandes os esforços de entidades publicas e privadas por encontrar novas
439 fontes de resistência a begomovírus no Brasil. Desta forma é de suma importância
440 empregar todas aquelas fontes promissoras de resistência em programas de
441 melhoramento que permitam a obtenção de novas cultivares de tomate tolerantes a
442 begomovírus com um espectro de resistência que supere as atuais variedades
443 disponíveis no mercado brasileiro de sementes.

444 O presente trabalho teve como principal objetivo a caracterização das respostas
445 de subamostras de tomate pertencentes ao BGH da UFV quando inoculados com
446 begomovírus bissegmentados presentes no Brasil em condições de ambiente
447 protegido e de campo. As avaliações em ambiente controlado foram realizadas com
448 um isolado de ToYSV caracterizado por Andrade et al. (2006) e as avaliações de
449 campo foram realizadas em um local conhecido como uma área epidêmica dado a

450 frequência predominante de begomovírus, além da alta intensidade de populações do
451 inseto vetor. Este local tem sido escolhido como uma área representativa para
452 avaliação de materiais resistentes a infecção por begomovírus (Xavier et al. 2011).
453 As análises das sequências das amostras coletadas no campo, permitiram concluir
454 que na área amostrada a espécie ToSRV está amplamente disseminada e confirma os
455 relatos de Ferreira et al. (Ferreira et al. 2005), Cotrim et al. (Cotrim et al. 2007) e
456 Fernandes et al. (Fernandes et al. 2008) que descrevem a espécie como uma das
457 predominantes em tomateiro no Brasil.

458 Ao comparar as respostas das subamostras em ambas as condições
459 experimentais ficou demonstrado o potencial para avaliação de resistência a
460 begomovírus em ambientes e condições diferentes. As respostas quando inoculado
461 um único vírus, o ToYSV, por bombardeamento e a inoculação natural em campo
462 mostram as variações em intensidade dos sintomas, porcentagem de plantas
463 sintomáticas e plantas infectadas, sendo obtidos os maiores valores destas
464 características em plantas nos experimentos de campo. No campo foi observado, em
465 geral, maior severidade dos sintomas com medias de $84,64 \pm 15,44\%$ das plantas que
466 manifestaram sintomas visuais, $80,71 \pm 16,92\%$ das plantas com infecção viral
467 confirmada e $2,31 \pm 0,36$ das medias das notas atribuídas a sintomas se comparados a
468 inoculação do ToYSV, que em média nestas mesmas características manifestaram
469 valores de $64,12 \pm 27,54\%$; $68,25 \pm 25,32\%$ e $1,99 \pm 0,49$, respectivamente. As respostas
470 diferenciadas de algumas subamostras quando comparadas as duas condições
471 experimentais podem estar relacionadas ao agente etiológico, visto que a espécie
472 viral empregada no ambiente protegido (ToYSV) e a espécie presente no campo
473 (ToSRV) são distintas. Zakay et al. (1991), ao caracterizarem acessos de *S.*
474 *lycopersicum* resistentes ao TYLCV, concluíram que uma das maiores dificuldades
475 de selecionar fontes de resistência de material de bancos de germoplasma é a
476 variação que existe no material empregado, que origina variações que podem ser
477 expressas como diferentes níveis de severidade da doença, dificultando muitas vezes
478 as avaliações nestes tipos de materiais, e as vezes sendo específicas entre vírus-
479 hospedeiro como observado neste trabalho.

480 Fontes de resistência a um isolado de begomovírus obtido em Brasília, DF,
481 foram identificadas em acessos de *S. chilense*, *S. peruvianum* e *S. hirsutum*, com
482 ausência de sintomas em três, cinco e três acessos, respectivamente. Dentre estes, só
483 um acesso para cada espécie foi classificado como livre de vírus e nos demais

484 acessos foi observada infecção latente, detectada por meio de hibridização molecular
485 (Santana et al. 2001), evidenciando também a dificuldade na obtenção de materiais
486 imunes. Neste trabalho nenhuma das subamostras nas duas condições avaliadas
487 mostrou-se com comportamento de imunidade a begomovírus. Após a inoculação do
488 ToYSV, seis subamostras (BGH-2129, BGH-2144, BGH-2150, BGH-6878, BGH-
489 6881 e BGH-7197) não manifestaram sintomas. A ausência de sintomas visuais não
490 constitui uma ferramenta definitiva de classificação de um material resistente ou
491 tolerante a begomovírus já que podem existir infecções latentes, fazendo-se
492 necessário a confirmação da presença ou ausência de infecção viral por meio de
493 algum teste molecular específico. Neste trabalho foi utilizada hibridização não
494 radioativa. Pôde-se observar então que das seis subamostras apenas uma não estava
495 infectada (BGH-2050). Em condições de campo duas subamostras (BGH-2080 e
496 BGH-6881) destacaram-se das demais ao exibirem baixa incidência da doença
497 comparadas com as demais subamostras e os controles.

498 Apesar dos esforços de numerosos grupos de pesquisa em desenvolverem
499 materiais resistentes a begomovírus no Brasil (Aguilera et al. 2008; Aguilera et al.
500 2011b; Ferraz et al. 2003; Ferreira et al. 1999; Giordano et al. 2005; Lourenção et al.
501 2004; Matos et al. 2003; Xavier et al. 2011) e no mundo (Mejía et al. 2005; Pérez de
502 Castro et al. 2008; Picó et al. 1999; Picó et al. 2001; Piven et al. 1995; Tripathi and
503 Varma 2003; Xue-Yu et al. 2007), não se tem relatos de materiais comerciais imunes
504 a estas doenças. Por isso é de grande interesse fazer uso de todos aqueles materiais
505 promissores que foram caracterizados. Além disso, implementar estratégias como a
506 combinação de genes de resistência de diferentes fontes que podem ser
507 empregados para alcançar níveis mais elevados de resistência e torná-la mais durável
508 (Pérez de Castro et al., 2008).

509 Ao considerar ambas as condições experimentais, recomendamos como as su-
510 bamostras mais promissoras BGH-2080 e BGH-6881 de acordo com as característi-
511 cas avaliadas. A subamostra BGH-2080 é da espécie *S. lycopersicum* e a BGH-6881
512 é da espécie *S. peruvianum*. Estudo realizado recentemente por Aguilera et al. (
513 2011a), buscando a identificação dos genes de resistência a geminivírus *Ty-2* e *Ty-3*
514 em subamostras de tomateiro do BGH da UFV, identificaram a subamostra BGH-
515 6881 como portadora de ambos os genes em heterozigose, o que permite relacionar a
516 presença dos genes com a resposta de tolerância desta subamostra à infecção por
517 ToYSV e ToSRV. Já a subamostras BGH-2080 não foi portadora de nenhum destes

genes de resistência (Aguilera et al., 2011a), o que indica que a resposta obtida nesta subamostra pode estar sendo influenciada por outro gene ou conjunto de genes, fazendo-se necessário a realização de estudos posteriores para confirmar esta hipótese.

Aguilera et al. (2011a) encontraram o gene *Ty-2* em homozigose nas subamostras BGH-6878 e BGH-6897, porém neste estudo estas duas subamostras tiveram comportamento diferente da subamostra BGH-6881 (portadora dos alelos dos genes *Ty-2* e *Ty-3* em heterozigose) ao serem classificadas como suscetíveis (Tabela 2). A subamostra BGH-6878 teve um comportamento favorável ante o ToYSV não manifestando sintomas visuais e baixas porcentagem de plantas com infecção viral. Porém, quando avaliada em condições de campo o espectro de resistência do alelo do gene *Ty-2* presente nessa subamostra não manteve a mesma resposta, que mesmo apresentando baixos níveis de sintomas visuais (1,90) foram detectados altos níveis de infecção viral, com 70% das plantas avaliadas com sintomas e 60 % das plantas confirmadas para presença de begomovírus, o que a coloca como material suscetível nesta condição. A subamostra BGH-6897, portadora de alelo do gene *Ty-2*, também manifestou um comportamento de suscetibilidade aos begomovírus testados em ambas as condições. Estes resultados evidenciam que o espectro de resistência do alelo do gene *Ty-2* em homozigose descrito por Aguilera et al. (2011a) nessas duas subamostras não confere resistência aos begomovírus presentes no campo nas condições avaliadas. Resultados semelhantes foram obtidos por Mejías et al. (2005) ao avaliar um material portador do gene *Ty-2* (H24), onde também foi observado que este gene não ofereceu resistência a begomovírus presentes na Guatemala. Esta linhagem foi também suscetível quando a inoculação foi mediada pelo inseto vetor e via agroinoculação na seleção de subamostras de *Solanum* frente ao begomovírus *Tomato leaf curl virus* (ToLCV) (Tripathi and Varma 2003; Xue-Yu et al. 2007). Quando *Ty-2* esteve em combinação com outro gene, como descrito na subamostra BGH-6881, a resposta ou espectro de resistência foi melhor, contudo não se pode descartar a possibilidade desta resposta estar relacionada somente ao alelo do gene *Ty-3*, visto que nenhuma das subamostras avaliadas continha apenas este alelo.

Dentre as espécies silvestres empregadas em programas de melhoramento da cultura do tomate as que são mais promissoras são os acessos da espécie *S. habrochaites*, não somente por serem resistentes a grande número de pragas e doenças, mas também por serem facilmente cruzadas com *S. lycopersicum* (Leite

2004). A subamostra BGH-6902, também da espécie *S. habrochaites*, foi relatada por Juhász et al. (2008) e Abreu et al. (2008) como resistente ao potivírus *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) e a *Phytophthora infestans*, respectivamente. Uma subamostra (BGH-6901) da mesma espécie foi empregada em nosso estudo e mostrou um bom comportamento para resistência ao ToYSV quando inoculado em ambiente protegido, mas em condições de campo teve alta incidência de begomovírus, com 80 % das plantas com sintomas visuais, 60% de plantas com infecção viral e notas dos sintomas visuais com media de 2,30.

A partir destes resultados pode-se observar a ampla gama de espécies dentro do gênero *Solanum* que têm sido caracterizadas como fontes de resistência a begomovírus. Na cultura do tomateiro a espécie *S. lycopersicum*, comparada às demais espécies do gênero, é a mais suscetível à mosca-branca e outros agentes fitopatogênicos, contudo do ponto de vista de melhoramento é a mais adequada por ser a única espécie cultivada comercialmente (Leite, 2004), o que facilita a incorporação da fonte de resistência identificadas (BGH-2080). Isto evidencia a importância da fonte promissora de resistência obtida a partir da subamostra da espécie *S. lycopersicum* caracterizada neste trabalho, a qual pode ser facilmente incorporada em programa de melhoramento da cultura.

Em conclusão, este estudo demonstrou que as subamostras de tomate selecionadas constituem fontes promissoras de resistência a begomovírus. Ao comparar o espectro de resistência oferecido pelos genes de resistência *Ty-2* e *Ty-3* a melhor resposta foi obtida pela combinação dos gene *Ty-2* e *Ty-3* presente na subamostra BGH-6881, e não pela presença individual dos genes, contudo observando que nenhuma das subamostra testadas era portadora somente do *Ty-3*. A combinação de métodos de inoculação (natural e bombardeamento), características descritivas da doença (porcentagem de sintomas visuais e de infecção viral) e métodos semiquantitativos de estimação dos sintomas visuais permitiram uma melhor diferenciação e caracterização das respostas das subamostras, possibilitando uma seleção mais adequada daqueles materiais mais promissores, evitando dessa forma a seleção de possíveis falsos positivos. Pesquisas adicionais serão necessárias para realizar cruzamentos com variedades comerciais suscetíveis e determinar o número de genes envolvidos nas respostas da subamostra BGH-2080, sendo ideal a identificação de marcadores moleculares ligados aos genes de resistência nas gerações obtidas dos cruzamentos, a fim de acelerar o programa de melhoramento do

586 tomateiro.

587

588

AGRADECIMENTOS

589 Os autores agradecem à FAPEMIG pela concessão de bolsa de pesquisa ao
590 primeiro autor do trabalho e à CAPES, pelo financiamento do projeto de cooperação
591 bilateral internacional CAPES-MES 067/09.

592

593

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

594 Abreu FB, Silva DJH, Cruz CD, Mizubuti ESG (2008) Inheritance of resistance to
595 *Phytophthora infestans* (Peronosporales, Pythiaceae) in a new source of
596 resistance in tomato (*Solanum* sp. (formerly *Lycopersicon* sp.)), Solanales,
597 Solanaceae). Genetics and Molecular Biology 31 (2):493-497

598 Aguilera JG, Alves Júnior M, Elsayed AYAM, Flores MP, Silva DJH, Zerbini FM
599 (2008) Screening for resistance to *Tomato yellow spot virus* (ToYSV) in tomato
600 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) germplasm using two methods of inoculation.
601 Egyptian Journal of Agricultural Research 86 (3):1207-1216

602 Aguilera JG, Hurtado FD, Xavier CAD, Laurindo BS, Nick C, Gil MÁ, Silva DJHd,
603 Zerbini FM (2011a) Identificação dos genes *Ty-2* e *Ty-3* de resistência a
604 begomovírus em genótipos de tomateiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira 46
605 (7):772-775

606 Aguilera JG, Malta AWO, Flores MP, Almeida VO, Nick C, Xavier CAD, Silva DJH,
607 Zerbini FM (2011b) Characterization of the resistance of tomato accessions from
608 the BGH-UFV to the geminivírus *Tomato yellow spot virus*. Revista Brasileira de
609 Agropecuária Sustentável 1 (1):66-70

610 Ambrozevicius LP, Andrade EC, Calegario RF, Fontes EPB, Zerbini FM (2000)
611 Molecular cloning and characterization of TGV-Ig, a tomato-infecting
612 *Begomovirus* from Minas Gerais state. Virus Reviews and Research 5
613 (Supplement):196

614 Ambrozevicius LP, Calegario RF, Fontes EPB, Carvalho MG, Zerbini FM (2002)
615 Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in
616 Southeastern Brazil. Fitopatologia Brasileira 27 (4):372-377

617 Andrade EC, Ambrozevicius LP, Calegario RF, Fontes EPB, Zerbini FM (2002)
618 Molecular cloning and characterization of *Tomato chlorotic mottle virus*

619 (TCMV), a new tomato-infecting begomovirus. *Virus Reviews and Research* 7
620 (Supplement):153

621 Andrade EC, Manhani GG, Alfenas PF, Calegario RF, Fontes EPB, Zerbini FM
622 (2006) *Tomato yellow spot virus*, a tomato-infecting begomovirus from Brazil
623 with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants
624 with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. *Journal of General Virology*
625 87:3687-3696

626 Aragão FJL, Barros LMG, Brasileiro ACM, Ribeiro SG, Smith FD, Sanford JC, Faria
627 JC, Rech EL (1996) Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus*
628 *vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoretical and Applied*
629 *Genetics* 93:142-150

630 Bedford ID, Briddon RW, Brown JK, Rosell RC, Markham PG (1994) Geminivirus
631 transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius)
632 biotypes from different geographical regions. *Annals of Applied Biology*
633 125:311-325

634 Bezerra IC, Lima MF, Ribeiro SG, Giordano LB, Zerbini FM, Ávila AC (1997)
635 Occurrence of geminivirus in tomato-producing areas in Submédio São
636 Francisco. *Fitopatologia Brasileira* 22:331

637 Castillo-Urquiza GP, Beserra Jr. JEA, Bruckner FP, Lima ATM, Varsani A, Alfenas-
638 Zerbini P, Zerbini FM (2008) Six novel begomoviruses infecting tomato and
639 associated weeds in Southeastern Brazil. *Arch Virol* 153:1985–1989

640 Cotrim AA, Krause-Sakate R, Narita N, Zerbini FM, Pavan MA (2007) Diversidade
641 genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste Paulista.
642 *Summa Phytopathologica* 33 (3):300-303

643 Cruz C (2006) Progra a GENES:Análises multivariada e simulação. Viçosa

644 Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: Version II.
645 *Plant Molecular Biology Reporter* 1:19-21

646 Faria JC, Bezerra IC, Zerbini FM, Ribeiro SG, Lima MF (2000) Situação atual das
647 geminiviroses no Brasil. *Fitopatologia brasileira* 25 (2):125-137

648 Faria JC, Souza-Dias JAC, Slack S, Maxwell DP (1997) A new geminivirus
649 associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil. *Plant Disease* 81:423

650 Fauquet CM, Briddon RW, Brown JK, Moriones E, Stanley J, Zerbini FM, Zhou X
651 (2008) Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology*

652 153:783-821

653 Fernandes F, de Albuquerque L, de Britto Giordano L, Boiteux L, de Azevedo A,
654 Inoue-Nagata A (2008) Diversity and prevalence of Brazilian bipartite
655 begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36 (1):251-258

656 Fernandes JJ, Carvalho MG, Andrade EC, Brommonschenkel SH, Fontes EPB,
657 Zerbini FM (2006) Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic*
658 *virus* (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. *Plant*
659 *Pathology* 55 (4):513-522

660 Fernandes MES, Silva DJH, Fernandes FL, Picanço MC (2009) Novos acessos de
661 tomateiro resistentes à mosca-branca biótipo B Pesquisa Agropecuária Brasileira
662 44 (11):1545-1548

663 Ferraz E, Resende LV, Lima GS, Silva MC, França JG, Silva. DJ (2003) Redenção:
664 nova cultivar de tomate para a indústria resistente a geminivírus e tospovírus.
665 *Horticultura Brasileira* 21 (3):578-580

666 Ferreira PTO, Bezerra IC, Villas-Boas GL, Ribeiro SG, Giordano LB (1999)
667 Avaliação de fontes de resistência a isolado de geminivírus com genoma
668 bipartido transmitido por *Bemisia argentifolli* em *Lycopersicon spp.*
669 *Fitopatologia Brasileira* 24:131-135

670 Ferreira SS, Alfenas PF, Lima ATM, Barros DR, Senna L, Zerbini FM (2005)
671 Detecção de begomovírus em tomateiro no município de Paty de Alferes, Rio de
672 Janeiro. *Fitopatologia Brasileira* 30:S183

673 França FH, Villas-Boas GL, Castelo-Branco M (1996) Ocorrência de *Bemisia*
674 *argentifolli* Bellows & Perring (Homoptera:Aleyrodidae) no Distrito Federal.
675 *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 25:369-372

676 Freitas-Astúa J, Purcifull DE, Polston JE, Hiebert E (2002) Traditional and
677 transgenic strategies for controlling tomato-infecting begomoviruses.
678 *Fitopatologia Brasileira* 27:437-449

679 Giordano LB, Bezerra IC, Ferreira PTO, Borges Neto CR (1999) Breeding tomatoes
680 for resistance to whitefly-transmitted geminivirus with bipartite genome in
681 Brazil. *Acta Horticulturae* 487:357-360

682 Giordano LB, Silva-Lobo VL, Santana FM, Fonseca MEN, Boiteux LS (2005)
683 Inheritance of resistance to the bipartite *Tomato chlorotic mottle* begomovirus
684 derived from *Lycopersicon esculentum* cv. 'Tyking'. *Euphytica* 143 (1-2):27-33

- 685 Inoue-Nagata AK, Albuquerque LC, Rocha WB, Nagata T (2004) A simple method
686 for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi 29
687 DNA polymerase. J Virol Methods 116 (2):209-211
- 688 Juhasz ACP, da Silva DJH, Zerbini FM, Soares BO, Aguilera GA (2006) Screening
689 of *Lycopersicon* sp accessions for resistance to *Pepper yellow mosaic virus*.
690 Scientia Agricola 63 (5):510-512
- 691 Leite GL (2004) Resistência de tomates a pragas. Unimontes Científica 6 (2):129-
692 140
- 693 Lima ATM (2008) Caracterização de dois begomovírus (*Tomato severe rugose virus*
694 e *Tomato yellow vein streak virus*) que infectam tomateiro e obtenção de clones
695 infecciosos. Dissertação, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG
- 696 Lima MF, Bezerra IC, Ribeiro SG, Ávila AC (2001) Distribuição de geminivírus nas
697 culturas do tomate e pimentão em doze municípios do Submédio do Vale do São
698 Francisco. Fitopatologia Brasileira 26:81-85
- 699 Lourenção AL, Melo AM, Siqueira WL, Colariccio A, Melo PC (2004) Avaliação da
700 resistência de acessos de tomateiro a tospovírus e a geminivírus. Horticultura
701 Brasileira 22 (2):193-196
- 702 Lourenção AL, Nagai H (1994) Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de
703 São Paulo. Bragantia 53:53-59
- 704 Matos E, Siqueira W, Lourenção A, Melo A, Sawazaki H, Sousa-Dias J, Colariccio A
705 (2003) Resistência de genótipos de tomateiro a um isolado de geminivírus do
706 cinturão verde de Campinas, São Paulo. Fitopatologia Brasileira 28 (2):159-165
- 707 Mejía L, Teni RE, Vidavski F, Czosnek H, Lapidot M, Nakhla MK, Maxwell DP
708 (2005) Evaluation of tomato germplasm and selection of breeding lines for
709 resistance to begomoviruses in Guatemala. Acta Horticulturae 695:251-255
- 710 Melo PCT (1992) Mosca branca ameaça produção de hortaliças. Asgrow do Brasil
711 Sementes Ltda., Technical Bulletin, Campinas, SP, Brazil
- 712 Morales FJ, Jones PG (2004) The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted
713 viruses in Latin America. Virus Res 100 (1):57-65
- 714 Moura MCCL, Zerbini FM, Silva DJH, Queiroz MA (2005) Reação de acessos de
715 *Cucurbita* sp. ao *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV). Horticultura Brasileira
716 23:206-210
- 717 Naranjo SE, Ellsworth PC (2001) Challenges and opportunities for pest management

- 718 of *Bemisia tabaci* in the new century. Crop Protection 20:707
- 719 Oliveira FA, da Silva DJH, Leite GLD, Jham GN, Picanço M (2009) Resistance of
720 57 greenhouse-grown accessions of *Lycopersicon esculentum* and three cultivars
721 to *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Scientia Horticulturae
722 119 (2):182-187
- 723 Pérez de Castro A, Díez MJ, Nuez F (2008) Exploiting partial resistance to *Tomato*
724 *yellow leaf curl virus* derived from *Solanum pimpinellifolium* UPV16991. Plant
725 Disease 92:1083-1090
- 726 Picó B, Ferriol M, Díez MJ, Nuez F (1999) Developing tomato breeding lines
727 resistant to *Tomato yellow leaf curl virus*. Plant Breeding 118:537-542
- 728 Picó B, Ferriol M, Díez MJ, Viñals FN (2001) Agroinoculation methods to screen
729 wild *lycopersicon* for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*. Journal of Plant
730 Pathology 83 (3):215-220
- 731 Piven NM, Uzcátegui RC, Infante DH (1995) Resistance to Tomato yellow mosaic
732 virus in species of *Lycopersicon*. Plant Disease 79 (6):590-594
- 733 Rezende EA, Filgueira FAR, Zerbini FM, Maciel-Zambolim E, Fernandes JJ,
734 Gilbertson RL (1996) Tomato infected with geminivirus in greenhouse conditions
735 at Uberlândia-MG, Brazil. Fitopatologia Brasileira 21:424
- 736 Ribeiro AC, Guimarães PTG, V. VHA (1999) Comissão de Fertilidade do Solo do
737 Estado de Minas Gerais Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes
738 em Minas Gerais - 5ª Aproximação. Viçosa, MG
- 739 Ribeiro SG, Ambrozevicius LP, Ávila AC, Bezerra IC, Calegario RF, Fernandes JJ,
740 Lima MF, Mello RN, Rocha H, Zerbini FM (2003) Distribution and genetic
741 diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. Archives of Virology 148
742 (2):281-295
- 743 Ribeiro SG, Mello LV, Boiteux LS, Kitajima EW, Faria JC (1994) Tomato infection
744 by a geminivirus in the Federal District, Brazil. Fitopatologia Brasileira 19:330
- 745 Rojas MR, Hagen C, Lucas WJ, Gilbertson RL (2005) Exploiting chinks in the
746 plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. Annual Review of
747 Phytopathology 43:361-394
- 748 Santana FM, Ribeiro SG, Moita AW, Moreira DJ, Giordano LB (2001) Sources of
749 resistance in *Lycopersicon* spp. to a bipartite whitefly-transmitted geminivirus
750 from Brazil. Euphytica 122 (1):45-51

- 751 Santos CD, Àvila AC, Resende RO (2003) Estudo da interação de um begomovírus
752 isolado de tomateiro com a mosca branca. *Fitopatologia Brasileira* 28 (6):664-
753 673
- 754 Santos CDG, Ávila AC, Inoue-Nagata AK, Resende RO (2004) Espécies vegetais
755 hospedeiras de begomovírus isolados de tomateiro em Goiás e no Distrito
756 Federal. *Fitopatologia Brasileira* 29:450-455
- 757 Scott AJ, Knott MA (1974) Cluster analysis method for grouping means in the
758 analysis of variance. *Biometrics* 30:507-512
- 759 Silva DJ, Moura MC, Casali VW (2001) Recursos genéticos do banco de
760 germoplasma de hortaliças da UFV: Histórico e expedições de coleta.
761 *Horticultura Brasileira* 19 (2):108-114
- 762 Stanley J, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Fauquet CM, Harrison BD, Rybicki
763 EP, Stenger DC (2005) Family *Geminiviridae*. In: Fauquet CM, Mayo MA,
764 Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds) *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the
765 International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San
766 Diego, pp 301-326
- 767 Suinaga FA, Casali VW, Silva DJ, Picanço MC (2003) Dissimilaridade genética de
768 fontes de resistência de *Lycopersicon* spp. a *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917)
769 (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Brasileira de Agrociência* 9 (4):371-376
- 770 Tripathi S, Varma A (2003) Identification of sources of resistance in *Lycopersicon*
771 species to Tomato leaf curl geminivirus (ToLCV) by agroinoculation. *Euphytica*
772 129 (1):43-52
- 773 Villas-Bôas GL, França FH, Macedo N (2002) Potencial biótico da mosca-branca
774 *Bemisia argentifolii* a diferentes plantas hospedeiras. *Horticultura Brasileira* 20
775 (1):71-79
- 776 Xavier CAD, Aguilera JG, Laurindo BS, Freitas RD, Soares MO, Silva DJH, Zerbini
777 FM (2011) Avaliação de subamostras de tomate para resistência a geminivirus em
778 condições de campo com infecção natural. In: ABH (ed) 51 Congresso Brasileiro
779 de Olericultura, Viçosa, 2011. pp 3325-3333
- 780 Xue-Yu B, Thomas MR, Rasheed MS, Saeed M, Hanson P, Barro PJ, Rezaian MA
781 (2007) A recessive allele (*tgr-1*) conditioning tomato resistance to geminivirus
782 infection is associated with impaired viral movement. *Phytopathology* 97:930-
783 937

- 784 Zakay Y, Navot N, Zeidan M, Kedar N, Rabinowitch H, Czosnek H, Zamir D (1991)
785 Screening Lycopersicon Accessions for Resistance to Tomato Yellow Leaf Curl
786 Virus: Presence of Viral DNA and Symptom Development. Plant Disease 75
787 (3):279-281
- 788 Zerbini FM, Guimarães LMS, Alfenas-Zerbini P (2007) Principais viroses do
789 tomateiro e seu controle. In: Silva DJH (ed) Tomate - Tecnologia de Produção.
790 UFV, Viçosa, MG, pp 257-281

**Capitulo III. ESTRUTURA GENÉTICA DE UMA POPULAÇÃO DE *Tomato*
severe rugose virus NO SUDESTE DO BRASIL**

Estrutura genética de uma população de *Tomato severe rugose virus* no Sudeste do Brasil

Jorge González Aguilera⁽¹⁾, Sheila dos Santos Tavares⁽⁵⁾, Roberto Ramos Sobrinho⁽⁴⁾, Cesar Augusto Diniz Xavier⁽⁴⁾, Francisco Dueñas Hurtado⁽³⁾, Regla Mercedes Lara Rodrigues⁽³⁾, Derly José Henriques da Silva⁽²⁾ e Francisco Murilo Zerbini⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Viçosa (UFV), CEP 36570-000, Viçosa, MG, Brasil. E-mail: j51173@yahoo.com. ⁽²⁾ Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa (UFV), CEP 36570-000, Viçosa, MG, Brasil. E-mail: derly@ufv.br. ⁽³⁾ Genética y Mejora de Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), La Habana, Cuba. E-mail: franko@inca.edu.cu, mlara@inca.edu.cu. ⁽⁴⁾ Fitopatologia, Laboratório de Virologia Vegetal Molecular (LVVM), BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa (UFV), CEP 36570-000, Viçosa, MG, Brasil. E-mail: cesar.xavier@ufv.br, zerbini@ufv.br, roberto.ramos@ufv.br. ⁽⁵⁾ Universidade Federal de Alagoas, Unidade Acadêmica Centro de Ciências Agrárias, Alagoas, Brasil. E-mail: scheyllast@hotmail.com

RESUMO

O estudo de populações de vírus tem permitido ampliar o conhecimento da diversidade, ecologia e epidemiologia de populações de vírus no campo, alcançando um maior conhecimento da interação vírus-hospedeiro, assim como, tem gerado informações de parâmetros genéticos das populações e com isto tem permitido descrever melhor as doenças e suas características biológicas. O objetivo desse estudo foi caracterizar a estrutura genética de uma população de vírus obtida a partir de amostras de tomate no Sudeste do Brasil. 65 amostras foram coletadas em tomate em Viçosa (MG) em 2009 e 2010. Os genomas virais foram amplificados, clonados e sequenciados. As sequências foram empregadas para análise filogenética e de recombinação. Foram obtidos 36 genomas completos de DNA-A (14 do ano 2009 e 22 do ano 2010). Ao utilizar a análise de identidade das sequências e árvore filogenética foi observada a presença de uma única espécie de begomovírus, *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), com valores de identidade de nucleotídeos que variaram entre 97,9 a 100%. Pelo teste de subdivisão de populações ($F_{st} = 0,036$) foi indicado que as duas subpopulações (2009 e 2010) não estão estruturadas, indicando a existência de uma única população viral. Mediante análise dos descritores gerais da população de ToSRV, comparada com outras seis populações de begomovírus descritas no Brasil foi evidenciado variabilidade genética semelhante a outras populações de begomovírus descritas que infectam tomateiro. Com o teste de neutralidade para todas as ORFs foi sugerido a ocorrência de seleção negativa

37 (purificadora) ou um evento demográfico recente como expansão da população. Com
38 a análise de recombinação foi identificado para todos os clones eventos de
39 recombinação sugerindo como progenitores um begomovírus de tomate e um de
40 *Sida*. Mediante a presença do ToSRV no campo e a confirmação de eventos de
41 recombinação permitem afirmar que o contínuo monitoramento da evolução das
42 populações de vírus no campo vai permitir traçar estratégias futuras de controle e de
43 epidemiologia dos begomovírus em regiões produtoras de tomate.

44 **Palavras-chave:** begomovírus, germoplasma, recombinação.

45

46 **Population genetic structure of *Tomato severe rugose virus* in** 47 **Southeastern Brazil**

48 **ABSTRACT**

49 The study of virus populations has enabled better understanding of diversity, ecology
50 and epidemiology of virus populations in the field, reaching a better understanding of
51 virus-host interaction, and has generated information of genetic parameters of the
52 populations which allow better description of the diseases and their biological
53 characteristics. The aim of this study was to characterize the genetic structure of a
54 virus population obtained from tomato samples in the southeastern of Brazil. A total
55 of 65 tomato samples were collected in Viçosa (MG) in 2009 and 2010. The viral
56 genomes were amplified, cloned and sequenced. The sequences were used for
57 phylogenetic and recombination analysis. It was obtained a total of 36 complete
58 genomes of DNA-A (14 of 2009 and 22 the year 2010). When used analysis of
59 identity of the sequences and the phylogenetic tree, it was observed the presence of a
60 single species of begomoviruses, *Tomato severe rugose virus* (ToSRV), with identity
61 values ranging from 97,9 to 100%. By the subdivision test of populations ($F_{st} =$
62 0,036), it was indicated that the two subpopulations (2009 and 2010) are not
63 structured, indicating the existence of a single viral population. The analysis of the
64 general descriptors of the population of ToSRV, compared to six other populations of
65 begomoviruses described in Brazil showed genetic variability similar to other
66 populations of begomoviruses infecting tomato. The test of neutrality for all ORFs
67 suggested the occurrence of negative selection (purifying) or a recent demographic
68 event as the population expansion. With the recombinant analysis, it was identified,
69 for all clones, recombination events that suggest as parental one begomovirus of
70 tomato and *Sida*. The prevalence of ToSRV in the field and the confirmation of

71 recombination events have revealed that the continuous monitoring of the evolution
72 of virus populations in the field will enable to design future strategies of control and
73 epidemiology of begomoviruses in tomato-producing areas.

74 **Keywords:** geminivirus, germplasm, recombination.

76 INTRODUÇÃO

77 Os membros da família *Geminiviridae* são vírus de plantas com genoma de
78 DNA circular de fita simples encapsidado em partículas icosaédricas geminadas
79 (Rojas et al., 2005). A família é dividida em quatro gêneros (*Mastrevirus*,
80 *Curtovirus*, *Topocovirus* e *Begomovirus*) de acordo com o tipo de inseto vetor, gama
81 de hospedeiros, organização do genoma e filogenia (Stanley et al., 2005a). Os vírus
82 classificados dentro do gênero *Begomovirus* são transmitidos por mosca branca
83 (*Bemisia tabaci* - Homoptera: Aleyrodidae) de modo circulativo não-propagativo e
84 infectam plantas dicotiledôneas podendo ter um ou dois componentes genômicos.
85 Espécies de begomovírus que ocorrem no “Velho Mundo” possuem apenas um
86 componente genômico e frequentemente estão associados a um DNA satélite
87 denominado DNA β (Mansoor et al., 2003). Por outro lado, begomovírus
88 encontrados no “Novo Mundo” possuem dois componentes denominados DNA-A e
89 DNA-B. No DNA-A encontram-se os genes envolvidos na replicação e encapsidação
90 da progênie viral, enquanto no DNA-B encontram-se os genes responsáveis pelos
91 movimentos intra- e intercelular (Lazarowitz, 1992). Ambos os componentes são
92 requeridos para a infecção sistêmica do hospedeiro. Dentre os begomovírus de maior
93 importância econômica estão *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV – espécie
94 tipo do gênero) afetando principalmente feijão, *Tomato yellow leaf curl virus*
95 (TYLCV) afetando a cultura do tomate e *African cassava mosaic virus* (ACMV)
96 infectando mandioca (Stanley et al., 2005a).

97 Problemas fitossanitários associados a insetos do gênero *Bemisia* têm se
98 tornado cada vez mais frequentes em regiões tropicais e subtropicais (Bedford et al.,
99 1994a; Morales & Jones, 2004; Naranjo & Ellsworth, 2001; Prasanna et al., 2010;
100 Seal et al., 2006; Villas-Bôas et al., 2002). Conjuntamente com o aumento
101 populacional da mosca-branca, tem ocorrido aumento na incidência de
102 begomoviroses ocasionadas pela transmissão natural por esse inseto, tornando-se um
103 dos principais problemas na cultura do tomateiro no Brasil (Castillo-Urquiza et al.,
104 2008; Cotrim et al., 2007b; Fernandes et al., 2008a; Inoue-Nagata et al., 2006; Lima

105 et al., 2001; Lourenção & Nagai, 1994).

106 No Brasil até o ano 1994 tinha sido relatado apenas o *Tomato golden mosaic*
107 *virus* (TGMV) afetando a cultura do tomateiro (Costa, 1975), porém, até 2009 já
108 foram relatados dezesseis espécies de begomovírus infectando o tomateiro no Brasil:
109 *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV),
110 *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), *Tomato mottle leaf curl virus* (TMoLCV),
111 *Tomato crinkle virus* (ToCrV), *Tomato infectious yellows virus* (TIYV), *Tomato*
112 *severe rugose virus* (ToSRV), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), *Tomato mild*
113 *mosaic virus* (ToMIMV), *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV), *Tomato leaf*
114 *distortion virus* (ToLDV), *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), *Tomato chlorotic*
115 *vein virus* (TCIVV), *Tomato crinkle leaf yellow virus* (ToCrLYV), *Sida mottle virus*
116 (SiMoV) e *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV) (Andrade et al., 2006; Castillo-
117 Urquiza et al., 2008; Colariccio et al., 2006; Cotrim et al., 2007; Della-Vecchia et al.,
118 2007; Fernandes et al., 2008; Inoue-Nagata et al., 2006; Ribeiro et al., 2007).
119 Algumas delas estão presentes em várias regiões do país enquanto outras são
120 restritas a determinadas regiões (Zerbini, 2006).

121 O *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) é um dos begomovírus mais
122 comumente encontrados infectando tomateiro no Brasil (Barbosa et al., 2011;
123 Castillo-Urquiza et al., 2008; Colariccio et al., 2006; Fernandes et al., 2008; Rocha,
124 2011) Além do tomateiro foram realizados relatos de infecção do ToSRV em
125 pimentão (Nozaki et al., 2005) e batata (Souza-Dias et al., 2008) o que evidencia a
126 capacidade deste vírus de infectar e se manter em outras solanáceas. Barbosa et al.
127 (Barbosa et al., 2011) ao determinarem o gama de hospedeiros do ToSRV inoculado
128 por mosca branca em 33 espécies diferentes de plantas, detectaram infecção em 22
129 das espécies avaliadas, sendo 13 sintomáticas e nove assintomática, recomendando
130 então que dentre as estratégias de manejo da doença deve-se incluir o controle de
131 plantas daninhas perto dos campos de tomate, por estas serem possíveis fontes de
132 inóculo para as lavouras mais novas. Esta ampla distribuição pode ter importantes
133 implicações no manejo da doença e no desenvolvimento de cultivares resistentes a
134 ToSRV a nível de campo.

135 O estudo de populações de geminivírus de diferentes regiões tem ajudado no
136 conhecimento da evolução genética desses patógenos no campo (Castillo-Urquiza,
137 2008; Font et al., 2007; Ge et al., 2007; Prasanna et al., 2010; Ramos-Sobrinho et al.,
138 2010; Rocha, 2011). Esse tipo de informação tem sido empregada na procura de

139 novas estratégias de manejo, alcançando um maior conhecimento da epidemiologia
140 dos vírus no campo, assim como, tem gerado informações estatísticas de parâmetros
141 genéticos das populações que tem permitido conhecer as forças evolutivas que estão
142 incidindo na estabilidade das doenças e suas características biológicas em ambientes
143 naturais (Prasanna et al., 2010).

144 O objetivo deste trabalho foi determinar a estrutura genética de uma população
145 de ToSRV obtida a partir de amostras de tomate coletadas em Viçosa, Minas Gerais
146 em dois diferentes anos (2009 e 2010).

147

148 **MATERIAIS E MÉTODOS**

149 ***Coleta do material vegetal***

150 As coletas de amostras de tomate apresentando sintomas típicos de infecção
151 por begomovírus foram realizadas em experimentos conduzidos na área
152 experimental da Horta de Pesquisa da Universidade Federal de Viçosa (UFV)
153 localizada na Região da Zona da Mata de Minas Gerais, a latitude 20° 45' 14" S,
154 longitude 42° 52' 53" W e altitude de 648,74 m. As coletas foram realizadas em dois
155 períodos diferentes, Novembro/2009 e Dezembro/2010 (Tabela 1).

156

157 ***Amplificação e clonagem dos genomas virais***

158 O DNA total das plantas coletadas foi extraído de acordo com Dellaporta et al.
159 (1983). A confirmação da presença de begomovírus foi realizada por meio de
160 hibridização molecular não radioativa de acordo com as especificações do *Kit Dig*
161 *high Primer DNA labeling and detection starter kit II* (Roche Applied Sciences). Os
162 genomas virais foram amplificados via RCA (*rolling circle amplification*) segundo
163 Inoue-Nagata et al. (2004) utilizando-se a enzima DNA polimerase do bacteriófago
164 phi29. Alíquotas das amplificações foram submetidas, individualmente, a clivagens
165 com as enzimas de restrição *BamH* I, *Cla* I e *Kpn* I por 2 h segundo recomendações
166 do fabricante, para linearizar o genoma. Os produtos das reações foram então
167 analisados em gel de agarose a 0,7% corado com brometo de etídeo (5 µg/mL) e
168 visualizado sob luz UV. Amostras onde a clonagem foi confirmada foram submetidas
169 a uma digestão com a enzima *Hae* III (enzima de corte frequente), e o padrão
170 eletroforético utilizado para seleção dos clones a serem completamente sequenciadas
171 pela Macrogen, Inc. (Seul, Coréia do Sul). A primeira rodada de sequenciamento foi
172 realizada com os oligonucleotídeos M13 *Forward* e *Reverse*. Para sequenciamento

do genoma completo foram desenhados oligonucleotídeos internos (Tabela 2). As sequências foram montadas utilizando-se o programa DNAMAN v. 6 (Lynnon Biosoft Corporation).

176

Tabela 1. Subamostras de tomate (*S. lycopersicum*) cujo material biológico, para análise, foi coletado em área experimental da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa durante dos anos de avaliação a begomovírus em campo e condições de inoculação natural.

Código Subamostra ¹	Ano de Coleta	Nº. Amostras ²	Nº. Clones obtidos ³	Código dos clones
BGH-2131	2009	5	5	J17 ⁺ , J20 ⁺ , J21
	2010	6	6	J28, J29, J30, J31, J32, J33
BGH-2132	2009	5	4	J34, J35, J37, J38
	2010	5	5	J43, J44, J46 ⁺ , J47
BGH-2133	2009	5	1	J48
	2010	5	-	-
BGH-2135	2009	5	1	J80
	2010	8	3	J85, J86, J88
Débora [*]	2009	4	2	J247, J249
	2010	9	8	J259, J260, J261, J262, J263, J264, J266, J267
Fany ^{**}	2009	4	1	J254
	2010	4	4	J268, J269, J270, J271
Total		65	40	

⁽¹⁾ dado de passaporte no BGH-UFV disponíveis em www.bgh.ufv.br; ⁽²⁾ total de amostras coletas em experimentos conduzidos em DBC, com três blocos e apresentando sintomas característicos de begomovírus; ⁽³⁾ quantidade de clones obtidos a partir das amostras selecionadas; ^(*) controle suscetível e ^(**) controle tolerante a begomovírus; ⁽⁺⁾ amostras que tinham mais de um clone por amostra.

186

187

188

189

190

Tabela 2. Sequências de 16 oligonucleotídeos internos empregados para o sequenciamento completo dos diferentes clones obtidos a partir de amostras de tomate coletadas em campo, Viçosa 2009-2010.

193

Oligonucleotídeos	Clones*
JToS 1 - 5'CTCCGATCTCTAACCAACC3'	J21-1F, J28-1R, J29-1F, J30-2R, J31-1F, J32-1F, J33-1F, J34-2F, J35-7R, J37-1F, J38-2F, J44-1R, J46-1F, J46-2R, J47-1R, J48-1F, J247-2F, J249-1F, J259-1F, J260-2F, J261-1F, J262-1F, J263-1R, J264-1R, J266-1R, J252-1F, J254-1F, J267-1F, J269-1F, J270-1F, J271-1R
JToS 2 - 5'CTTTCCCGTTTCGAGAATCTCC3'	J21-1R, J28-1F, J29-1R, J30-2F, J31-1R, J31-6R, J33-1R, J34-2R, J35-7F, J36-2F, J36-2R, J37-1R, J38-2R, J44-1F, J46-1R, J46-2F, J47-1F, J48-1R, J247-2R, J249-1R, J259-1R, J260-2R, J261-1R, J262-1R, J263-1F, J264-1F, J266-1F
JToS 3 - 5'GGCCGCGCGATTTTCTTATC3'	J43-1F
JToS 4 - 5'GGGCCCAATCGAACATAACAC3'	J43-1R
JToS 5 - 5'CCTCATCTCCACGTGCTTCT3'	J33-1, J259-1
JToS 6 - 5'CCTCTTGCACTTCTTCCGTC3'	J17-1F, J80-1F, J20-1F, J20-2R, J86-1F, J17-4F, J88-1R, J81-2R, J85-3R
JToS 7 - 5'GAGCGCATTTTGAAGTCCG3'	J9-3R
JToS 8 - 5'CGTGCCATGGTAACCGG3'	J18-1F
JToS 9 - 5'GGAAGGTGCGTTAAAGGCT3'	J86-1F
JToS 10 - 5'GGGATGGGAGACGGGACCT3'	J89-1F
JToS 11 - 5'CAATCCCGACTTCTCTCCATG3'	J268-1F
JToS 12 - 5'GACACACAAATCACCTTCCC3'	J17-1R, J20-1R, J85-3F, J81-2F, J80-1R, J86-1R, J20-2F, J88-1F, J3-2R, J17-4F
JToS 13 - 5'GTCGATGCCTTAGACACATTATCAG3'	J9-3F, J18-1R, J268-1R
JToS 14 - 5'CTCTTGCACTTCTTCCGTCGAT3'	J3-2-F
JToS 15 - 5'CATGATGAGGCTCCGAAGAATC3'	J89-1-R
JToS 16 - 5'CGGCACCTCTCCCAAATAGTCATC3'	J252-1R, J254-1R, J267-1R, J269-1R, J270-1R, J271-1F

194 *os códigos representam os clones obtidos a partir das subamostras BGH-2131, BGH-2132, BGH-2133,
195 BGH-2135, Débora e Fany listados na Tabela 1.
196

197 *Comparações de sequências e análise filogenética*

198 As sequências correspondentes ao DNA-A dos isolados de begomovírus foram
199 inicialmente analisadas com o algoritmo BLASTn para determinar as espécies virais

200 com maior porcentagem de identidade de nucleotídeos com sequências disponíveis
201 no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), e em seguida foram
202 analisadas a fim de identificar as ORFs presentes no genoma viral, utilizando-se o
203 algoritmo ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>). Comparações
204 par a par foram geradas utilizando-se o programa DNAMAN v. 6 (*Lynnon Biosoft Corporation*) e estimada a porcentagem de identidade das sequências de
205 nucleotídeos do genoma completo entre os isolados encontrados e outros
206 begomovírus relatados anteriormente no Brasil. Empregou-se como critério para
207 demarcação de espécies dentro do gênero *Begomovirus* a porcentagem de identidade
208 de nucleotídeos do genoma completo (DNA-A) de 89% como estabelecido por
209 Fauquet et al. (2008). Alinhamentos múltiplos, incluindo os isolados obtidos e outros
210 begomovírus das Américas (Tabela 3), foram realizados utilizando-se o algoritmo
211 MUSCLE (Edgar, 2004). A árvore filogenética a partir do alinhamento do DNA-A
212 foi construída com MEGA 5.0 (Tamura et al., 2007) utilizando o método
213 “*Neighbour-Joining*” incluindo análise “*bootstrap*” com 10.000 repetições para
214 verificar a significância de cada ramo.
215

216

217 ***Estrutura e diferenciação genética da população de ToSRV***

218 Foram quantificados os principais descritores de variabilidade genética:
219 número de sítios segregantes (S), número total de mutações (Eta), número médio de
220 diferenças de nucleotídeos (k), diversidade nucleotídica (π), frequência de mutação,
221 número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (Hd), Watterson’s estimado da
222 taxa de mutação da população baseado no número total de sítios segregantes (θ_w -S)
223 e Watterson’s estimado da taxa de mutação da população baseado no número total de
224 mutações (θ -Eta). A análise foi realizada utilizando-se o programa DnaSP v. 5
225 (Librado & Rozas, 2009).

226 Os resultados foram comparados com dados referentes a populações de *Tomato*
227 *yellow vein streak virus* (ToYVSV) e *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV) da
228 região Sudeste do Brasil (municípios de Coimbra, MG e Paty do Alferes, RJ)
229 (Castillo-Urquiza, 2008), população de *Bean golden mosaic virus* (BGMV) a partir
230 de amostras de *Phaseolus lunatus* (fava) no estado de Alagoas (Ramos-Sobrinho et
231 al., 2010) e populações de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) no estado de MG em
232 Carandaí e Florestal (Rocha, 2011).

233

234 **Tabela 3.** Begomovírus empregados nas comparações de sequências, árvores
 235 filogenéticas e análises de recombinação.

Espécie	Sigla	Número do acesso no Genbank
Do Brasil		
<i>Bean golden mosaic virus</i>	BGMV	M88686
<i>Sida mosaic Brazil virus</i>	SiMBV	FN436001
<i>Sida micrantha mosaic virus</i>	SimMV	AJ557451
<i>Sida mottle virus</i>	SiMoV	AY090555
<i>Sida yellow mosaic virus</i>	SiYMV	AY090558
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>	ToCMoV	AF490004
<i>Tomato rugose mosaic virus</i>	ToRMV	AF291705
<i>Tomato rugose mosaic virus</i>	ToRMV	AF291705
<i>Tomato severe rugose virus</i>	ToSRV	DQ207749
<i>Tomato severe rugose virus</i>	ToSRV	HQ606467
<i>Tomato severe rugose virus</i>	ToSRV	FJ824808
<i>Tomato yellow spot virus</i>	ToYSV	DQ336350
<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	ToYVSV	EF417915
<i>Tomato mild mosaic virus</i>	ToMIMV	EU710752
<i>Sida common mosaic virus</i>	SiCmMV	EU710751
<i>Tomato leaf distortion virus</i>	ToLDV	EU710749
<i>Blainvillea yellow spot virus</i>	BIYSV	EU710756
<i>Sida yellow leaf curl virus</i>	SiYLCV	EU710750
<i>Tomato common mosaic virus</i>	ToCmMV	EU710754
De outros países na América		
<i>Sida golden yellow vein virus</i>	SiGYVV	AJ577395
<i>Sida yellow mosaic Yucatan virus</i>	SiYMYuV	DQ875872
<i>Sida yellow vein virus</i>	SiYVV	Y11099
<i>Tomato Chino La Paz virus</i>	ToChLPV	AY339618
<i>Tomato golden mottle virus</i>	ToGMoV	AF132852
<i>Tomato mosaic Havana virus</i>	ToMHV	EF088197
<i>Tomato mottle Taino virus</i>	ToMoTV	AF012300
<i>Tomato mottle virus</i>	ToMoV	AY965900
<i>Tomato severe leaf curl virus</i>	ToSLCV	AF130415
<i>Tomato leaf curl Sinaloa virus</i>	ToLCSV	AJ608286
<i>Tomato leaf curl Cuba virus</i>	ToLCCUV	AM050143
<i>Tomato yellow leaf distortion virus</i>	ToYLDV	FJ174698
Fora dos grupos		
<i>Tomato leaf curl New Delhi virus</i>	ToLCNDV	U15015

236

237 O programa DnaSP v. 5 (Librado & Rozas, 2009) foi utilizado para determinar
 238 a extensão da diferenciação genética ou nível de fluxo gênico entre as subpopulações
 239 (2009 e 2010) estimando-se o valor do Wright's *Fst* (Wright, 1951). O Wright's *Fst* é
 240 uma medida da proporção da variância genética total contida numa subpopulação

241 relativa à variância genética total. Valores podem variar entre 0 e 1 e valores de $F_{st} >$
242 0,05 (5%) sugerem um grau de diferenciação entre subpopulações.

243

244 **Análise dos mecanismos de seleção**

245 As sequências de nucleotídeos das ORFs presentes no DNA-A (*cp*, proteína
246 da capa; *rep*, proteína associada à replicação; *trap*, proteína de trans-ativação; *ren*,
247 proteína amplificadora da replicação; e *ac4*) foram alinhadas usando o algoritmo
248 MUSCLE (Edgar, 2004). Foram computados, para cada ORF, os testes de
249 neutralidade: Tajima's D (Tajima, 1989), Fu and Li's D^* e F^* (Fu & Li, 1993)
250 utilizando o programa DnaSP v. 5 (Librado & Rozas, 2009).

251

252 **Análise da recombinação**

253 Para investigar possíveis eventos de recombinação, sequências completas de
254 begomovírus já relatados no Brasil juntamente com os isolados de plantas de tomate
255 deste trabalho, foram inicialmente alinhadas utilizando-se o algoritmo MUSCLE
256 (Edgar, 2004). Evidências filogenéticas para recombinação foram inicialmente
257 detectada por meio da análise de recombinação como implementado no programa
258 SplitsTree v. 4.1 (Huson & Bryant, 2006). Eventos de recombinação, possíveis
259 parentais e breakpoints de recombinação foram identificados utilizando-se o
260 programa RDP v. 3.0 (Martin et al., 2010).

261

262 **RESULTADOS**

263 **Detecção viral e clonagem dos genomas virais**

264 Amostras foliares de tomateiro mantidos em campo na Horta Experimental da
265 UFV foram coletadas em duas épocas diferentes (Novembro/2009 e
266 Dezembro/2010). Ao todo foram coletadas 65 amostras, sendo 28 do ano 2009 e 37
267 do ano 2010. O DNA das 65 amostras coletadas, previamente confirmadas positivas
268 por meio do teste de hibridização não radioativa (dados não amostrados), foram
269 amplificadas por meio de RCA e confirmada a presença de um fragmento de mais de
270 12.000 pares de base (pb), correspondente ao multímero linear contendo várias
271 cópias do genoma viral observado para cada reação. Foram escolhidos, através dos
272 diferentes padrões de clivagem com a enzima de corte frequente *Hae* III, um total de
273 36 clones para serem completamente sequenciados.

274

275 ***Comparação de sequências e análise filogenética***

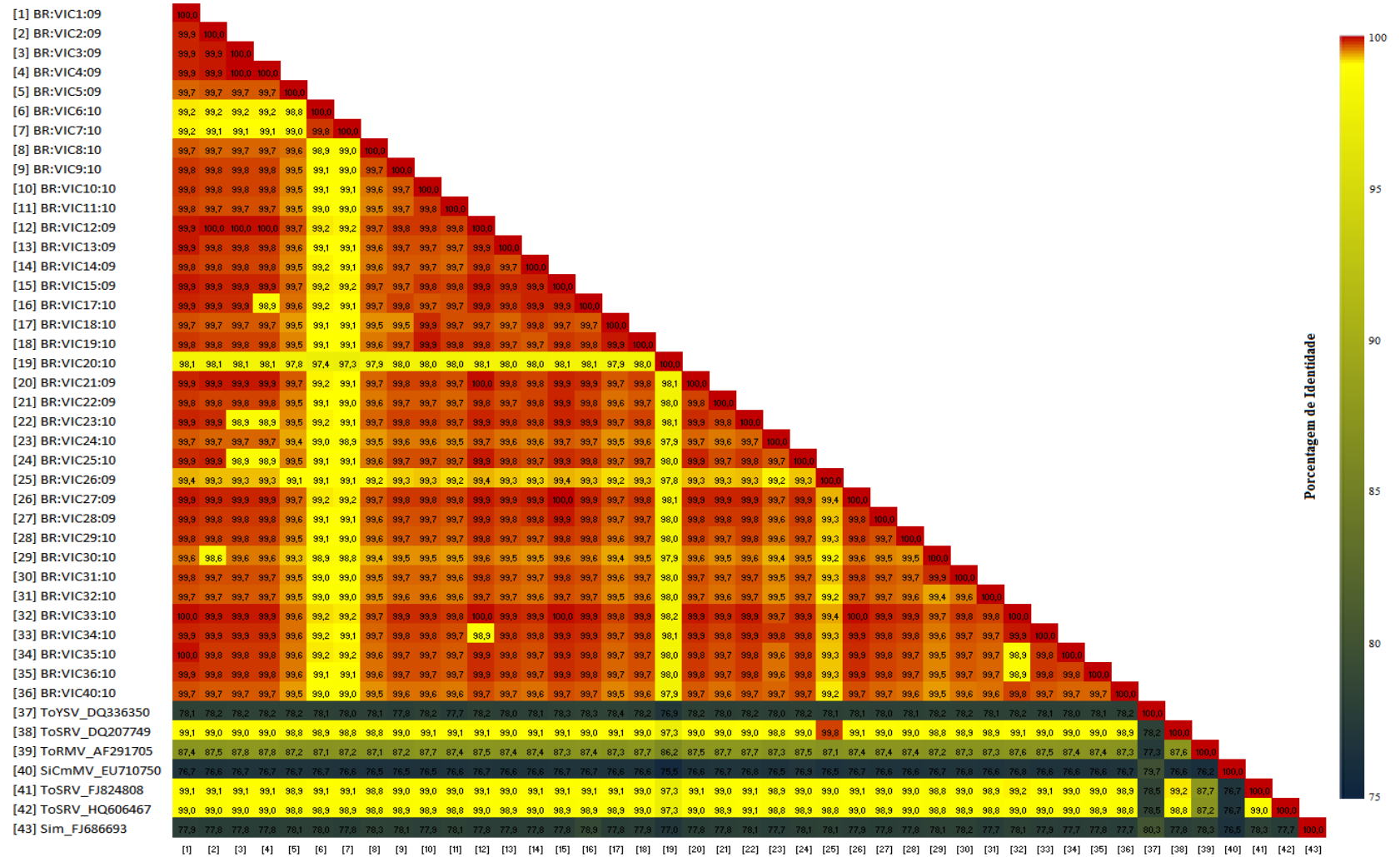
276 A análise das sequências dos 36 clones obtidos, os quais correspondiam ao
277 DNA-A, indicaram a presença do vírus *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) em 100
278 % dos clones, como mostrado na matriz de identidade das sequências (Figura 1). Ao
279 comparar todos os clones entre eles a porcentagem de identidade variou de 97,9 a
280 100% (Figura 1), o que evidencia a alta homogeneidade das sequências obtidas. Este
281 resultado foi confirmado pela análise filogenética (dados não mostrados). Todos os
282 clones agruparam-se em um único ramo e dentre eles o isolado BR:Vic20:10, ainda
283 que no mesmo ramo, está um pouco mais distante em comparação com o restante dos
284 clones avaliados. Todos eles agruparam-se com o ToSRV (DQ207749) com 100 %
285 de confiabilidade. Os isolados deste trabalho formaram um grupo com isolados de
286 begomovírus descritos no Brasil, o qual divergiu de outro grupo formado por outros
287 begomovírus descritos nas Américas (dados não mostrados).

288

289 ***Estrutura genética e testes de neutralidade da população de ToSRV***

290 Com o objetivo de obter maior informação a respeito da evolução do
291 begomovírus descrito neste trabalho, inicialmente os clones foram divididos em duas
292 populações ao considerar os anos de coleta (2009 com 14 clones e 2010 com 22
293 clones) e foram submetidos a um teste de subdivisão de populações. O teste de
294 subdivisão ($F_{st} = 0,036$) indicou valores de $F_{st} < 0,05$ (5%) sugerindo que as duas
295 possíveis subpopulações inicialmente formadas não estão estruturadas, sendo então
296 tratadas a partir deste momento como uma única população.

297 Na Tabela 4 são apresentados os descritores gerais da população de ToSRV
298 formada por 36 clones com genoma de tamanho 2593nt obtida neste trabalho. A
299 população de ToSRV obtida em Viçosa, ao ser comparada com duas outras
300 populações de ToSRV descritas por Rocha (Rocha, 2011) apresentou valores
301 semelhantes nos descritores das populações, porém com número médio de diferenças
302 de nucleotídeos entre as sequências (K), diversidade nucleotídica (π), frequência de
303 mutação e diversidade haplotípica (Hd) com valores que foram superiores aos da
304 população de Carandaí mas inferiores aos da população de Florestal (Tabela 4).



310 Quando comparadas a população de Viçosa do ToSRV com as populações de
311 BGMV, ToCmMV e ToYVSV, os valores foram inferiores em ToSRV para todos os
312 descritores da população. A população de BGMV descrita por Ramos-Sobrinho *et al.*
313 (Ramos-Sobrinho et al., 2010) obtida a partir de *Phaseolus lunatus* apresentou os
314 maiores valores se considerarmos todos os descritores, refletindo na maior
315 diversidade genética desta população.

316 Os testes de neutralidade foram aplicados para avaliar se há evidências de
317 seleção nas regiões genômicas que codificam os genes *cp*, *rep*, *ren*, *trap* e *ac4*
318 codificados pelo DNA-A (Tabela 5). Diferenças estatísticas foram obtidas para as
319 ORFs que codificam os genes *cp*, *rep* e *ren* considerando os três testes empregados
320 (Tajima *D*, Fu and Li's *D** e Fu and Li's *F**).

321 No entanto, mediante os três testes foi observada a não existência de
322 diferenças significativas nas ORFs dos genes *trap* e *ac4*, com exceção do teste de Fu
323 and Li's *F** que mostrou diferenças a 5% de probabilidade para o gene *ac4*. Todos os
324 valores obtidos foram negativos sugerindo a ocorrência de seleção negativa
325 (purificadora) ou o efeito de um evento demográfico recente como a expansão da
326 população (Tabela 5).

327

328 ***Análises de recombinação na população***

329 Os eventos de recombinação inferidos por filogenia dos isolados de ToSRV de
330 Viçosa – MG (dados não mostrados) foram adicionalmente confirmados pela análise
331 no programa RDP3 (Martin et al., 2010). A análise identificou para todos os isolados
332 descritos neste trabalho três sítios de recombinação. O primeiro foi observado na
333 maioria dos isolados, iniciando no nucleotídeo 1941 até o 2138 (início do gene *ac4* e
334 região intergênica da *rep*) sendo os possíveis parentais o *Tomato yellow vein streak*
335 *virus*, ToYVSV [EF417915] descrito em tomate e o *Sida micrantha mosaic virus*,
336 SimMV [AJ557451] descrito em *Sida*, com um valor *P* de $7,2 \times 10^{-16}$.

Tabela 4. Estrutura genética da população de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) a partir de tomate coletado em Viçosa-MG, comparado com populações de *Bean golden mosaic virus* (BGMV) a partir de *Phaseolus lunatus* (fava) no estado de Alagoas e populações de *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV) e *Tomato common mosaic virus* (ToCmMV) a partir de tomate no sudeste do Brasil. Dados baseados no DNA-A.

Populações		Tamanho	Nº de	S ^a	Eta ^b	k ^c	π^d	Frequência de mutação ^e	H ^f	Hd ^g	θ_w -S ^h	θ -Eta ⁱ
Vírus	Local	do genoma (nt)	sequências									
ToSRV	Viçosa, MG	2593	36	144	149	11,528	0,0045	1,6 x 10 ⁻³	34	0,997	0,0134	0,0139
	Carandaí, MG ¹	2589	19	73	74	10.474	0.0040	1,8 x 10 ⁻³	18	0,994	0,0080	0,0081
	Florestal, MG ¹	2592	5	37	37	19.000	0.0073	3,5 x 10 ⁻³	5	1,000	0,0068	0,0068
BGMV	Alagoas ²	2616	20	251	265	40,321	0,0154	5,0 x 10 ⁻³	18	0,989	0,0271	0,0295
ToCmMV	Paty de Alferes, RJ ³	2560	10	11	11	2,200	0,0009	4,3 x 10 ⁻⁴	8	0,933	0,0015	0,0015
ToCmMV	Coimbra, MG ³	2560	12	91	92	26,258	0,0103	3,0 x 10 ⁻³	11	0,985	0,0118	0,0119
ToYVSV	Paty de Alferes, RJ ³	2562	26	49	49	5,381	0,0021	7,4 x 10 ⁻⁴	25	0,997	0,0050	0,0050

^a Número de sítios segregantes; ^b Número total de mutações; ^c Número médio de diferenças de nucleotídeos entre sequências; ^d Diversidade nucleotídica estimada pelo número médio de diferenças de nucleotídeos por sítio; ^e Número total de mutações/Número total de nucleotídeos sequenciados; ^f Número total de haplótipos; ^g Diversidade haplotípica; ^h Watterson's estimado da taxa de mutação da população baseado no número total de sítios segregantes; ⁱ Watterson's estimado da taxa de mutação da população baseado no número total de mutações; ¹ dados obtidos por Rocha (2011); ² dados obtidos por Sobrinho (2010); ³ dados obtidos por Castillo-Urquiza (2008).

Tabela 5. Testes de neutralidade baseados em variações nos genes *cp*, *rep*, *ren*, *trap* e *ac4* dos isolados de *Tomato severe rugose virus* (ToSRV) a partir de tomate coletado em Viçosa-MG.

Testes/ORFs	<i>cp</i>	<i>rep</i>	<i>ren</i>	<i>trap</i>	<i>ac4</i>
Tajima <i>D</i>	-4,56*	-3,16*	-3,33*	-0,46 ^{NS}	-1,78 ^{NS}
Fu and Li's <i>D</i> *	-4,62*	-3,39*	-3,35*	-0,86 ^{NS}	-2,17 ^{NS}
Fu and Li's <i>F</i> *	-2,61**	-2,29**	-2,37**	-1,45 ^{NS}	-1,96*

*Valores para testes de neutralidade foram significativos ($P < 0.05$).

**Valores para testes de neutralidade foram significativos ($P < 0.01$).

^{NS}Valores para testes de neutralidade não significativos

O segundo evento de recombinação de recombinação foi obtido para os isolados BR:Vic09:10, BR:Vic11:10, BR:Vic15:09 e BR:Vic18:10 iniciando no nucleotídeo 1942 e terminando em 2139 (dentro do gene *ac4* e *rep*) com os mesmos parentais e valor *P* do primeiro. O terceiro evento de recombinação iniciando no nucleotídeo 1778 e terminando em 2559 (dentro do gene *rep*) com os mesmos parentais e valor *P* dos outros dois eventos de recombinação, sendo obtido apenas para os isolados BR:Vic24:10 e BR:Vic40:10. O isolado BR:Vic20:10 junto com o isolado *Blainvillea yellow spot virus*, BIYSV [EU710756] descrito em *Blainvillea*, foram reconhecidos pelo programa como possíveis parentais do isolado de ToRMV [AF291705], identificando o evento de recombinação iniciando no nucleotídeo 1520 e terminando no 61 (inclui os genes *cp* e *trap*) com um valor *P* de 2.4×10^{-32} .

DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a diversidade e a estrutura genética de uma população de ToSRV obtida de amostras de tomate cultivados no campo, coletadas em um mesmo local em dois diferentes anos (2009 e 2010). O local das coletas é uma área experimental onde ao longo dos últimos anos são mantidos cultivos de tomate, sendo frequentemente relatado a presença de sintomas de begomovírus e altas populações do inseto vetor (mosca branca) o que tem facilitado a ocorrência destas viroses.

Tabela 6. Eventos de recombinação detectados em begomovírus infectando tomate no estado de Minas Gerais, Brasil baseado em dados que incluem somente begomovírus do Brasil.

Recombinante	Breakpoints		Parentais		Programas	valor <i>P</i>
	Inicial	Final	Maior	Menor		
BR:Vic01:09, BR:Vic02:09, BR:Vic03:09, BR:Vic04:09, BR:Vic05:09, BR:Vic06:10, BR:Vic07:10, BR:Vic08:10, BR:Vic10:10, BR:Vic12:09, BR:Vic13:09, BR:Vic14:09, BR:Vic17:10, BR:Vic19:10, BR:Vic20:10, BR:Vic21:09, BR:Vic22:09, BR:Vic23:10, BR:Vic25:10, BR:Vic26:09, BR:Vic27:09, BR:Vic28:09, BR:Vic29:10, BR:Vic30:10, BR:Vic31:10, BR:Vic32:10, BR:Vic33:10, BR:Vic34:10, BR:Vic35:10, BR:Vic36:10	1941	2138	ToYVSV	SimMV	R ^G BMCS	7,2 X 10 ⁻¹⁶
BR:Vic09:10, BR:Vic11:10, BR:Vic15:09, BR:Vic18:10	1942	2139	ToYVSV	SimMV	R ^G BMCS	7,2 X 10 ⁻¹⁶
BR:Vic24:10, BR:Vic40:10	1778	2559	ToYVSV	SimMV	R ^G BMCS	7,2 X 10 ⁻¹⁶
ToRMV_AF291705	1939	2167	ToYVSV	SimMV	R ^G BMCS	7,2 X 10 ⁻¹⁶
ToRMV_AF291705	1520	61	BIYSV	BR:Vic20:10	R ^G BMCS3	2,4 X 10 ⁻³²
ToSRV_DQ207749	1941	2138	ToYVSV	SimMV	R ^G BMCS	7,2 X 10 ⁻¹⁶
ToSRV_FJ824808	1941	2138	ToYVSV	SimMV	R ^G BMCS	7,2 X 10 ⁻¹⁶
ToSRV_HQ606467	1940	2131	ToYVSV	SimMV	R ^G BMCS	7,2 X 10 ⁻¹⁶

¹para simplificar a tabela são listados somente os isolados de cada espécie que apresentaram eventos de recombinação com os isolados de nosso trabalho; ²os números indicam onde é iniciado e terminado o site de clivagem de origem de replicação; ³siglas dos programas que indicaram recombinação R=RDV; G=GeneConv; B=Bootscan; M=MaxChi; C=CHIMAERA; S=SisScan; 3=3SEQ. As programas destacadas em vermelho representam o programa de maior *P*-valor.

381 O local tem sido escolhido como área representativa para testes de seleção de
382 materiais resistentes a begomovírus em infecção natural (Xavier et al., 2011),
383 esperando-se encontrar nele diferentes espécies de begomovírus devido à grande
384 diversidade de sintomas encontrados em plantas daninhas e cultivos de interesse
385 agrícola como o tomateiro (Rocha, 2011).

386 Todos os clones (36) obtidos neste trabalho correspondiam a uma única
387 espécie de begomovírus, o ToSRV, indicando uma ampla distribuição deste vírus na
388 área amostrada. Este resultado contradiz o que era esperado, e isto pode estar
389 relacionado ao fato de todos os clones sequenciados terem sido obtidos a partir de
390 uma única enzima (*Bam* H I), fazendo com que boa parte da diversidade de espécies
391 de begomovírus presentes no campo não fosse representada. Com isso, não se pode
392 afirmar que o ToSRV está sendo prevalente na área amostrada, e outros estudos serão
393 necessários para confirmar esta hipótese.

394 A população de ToSRV não apresentou subdivisão de acordo com os anos de
395 coleta ($F_{st} = 0,036$), e com isso a análise da estrutura genética foi realizada
396 considerando uma única população formada pelos 36 clones de DNA-A a partir dos
397 anos de 2009 e 2010. Quando comparada a diversidade genética entre a população
398 de ToSRV deste trabalho com duas outras populações de ToSRV descritas por Rocha
399 (Rocha, 2011) em Carandaí/2008 e Florestal/2008, pode-se observar um nível de
400 variabilidade similar entre essas populações. Isto pode estar diretamente relacionado
401 a fatores do hospedeiro, visto que as três populações virais avaliadas foram obtidas a
402 partir de plantas de tomate com uma base genética semelhante. Esta hipótese é
403 reforçada quando comparados os resultados obtidos para as populações de
404 begomovírus infectando tomate e a população de BGMV infectando fava, onde se
405 pode observar uma maior variabilidade na população de BGMV, o qual infecta uma
406 planta com uma base genética mais ampla.

407 Com o objetivo de investigar as forças evolutivas que estavam atuando nos
408 diferentes genes que codificam as proteínas do vírus a partir do DNA-A, foram
409 realizados testes de neutralidade para cada ORF viral. Foi observado que as
410 mutações e a seleção purificadora são as forças evolutivas que estão influenciando
411 na estrutura genética da população de ToSRV de Viçosa, coincidindo com os
412 resultados obtidos por Rocha (Rocha, 2011). Durante o ciclo viral, diversos fatores
413 podem estar impondo seleção purificadora sobre a população de ToSRV. A biologia
414 do vetor *B. tabaci* e seus hábitos alimentares podem servir como um gargalo para

415 manutenção das características estruturais e funcionais do vírus. Outros fatores que
416 impõem seleção purificadora podem estar associados com fatores da planta
417 hospedeira (García-Arenal et al., 2001).

418 Segundo Rocha (Rocha, 2011) os dados obtidos a partir de cinco anos de
419 coleta sustentam a hipótese de que a colonização da cultura do tomate por
420 begomovírus tem ocorrido devido à existência de populações nativas em um
421 processo impulsionado pela alta frequência de mutação e recombinação que tem
422 permitido que alguns vírus sejam mais adaptados a cultura do tomate (ToCMoV,
423 ToCmMV e ToSRV em 95% das amostras) e outros menos adaptados (ToYSV,
424 ToLDV e ToMIMV). A ampla distribuição do ToSRV na região de Minas Gerais
425 (Viçosa, Carandaí e Florestal) tem implicações importantes para o manejo da doença
426 e o desenvolvimento de estratégias para obtenção de materiais de tomate resistentes
427 nestas regiões de Minas Gerais. Os processos evolutivos sobre estas populações
428 estão sendo pouco influenciados por fatores ambientais tais como as distâncias
429 geográficas, temperaturas, altitude, etc devido às poucas diferenças obtidas na
430 estrutura genética destas três populações.

431 O resultado das análises de recombinação na população de ToSRV deste
432 trabalho permitiu observar que os isolados obtidos mostraram três principais sítios
433 de recombinação, sendo dois destes sítios separados por apenas um nucleotídeo,
434 localizados na região inicial do gene *ac4* e na região intergênica da *rep*. Já o terceiro
435 sítio de recombinação foi observado na região dos genes *cp* e *trap*. Lefeuvre et al.
436 (Lefeuvre et al., 2007a) demonstraram que as regiões codificantes são geralmente
437 menos suscetíveis a recombinação, no entanto, as regiões que codificam a *cp* e a *rep*
438 de begomovírus têm sido demonstradas como sendo *hotspots* de recombinação
439 (Garcia-Andres et al., 2007b; Lefeuvre et al., 2007b), coincidindo com o resultado
440 obtido neste trabalho.

441 Vários trabalhos têm demonstrado que a recombinação é uma fonte comum e
442 importante na geração de diversidade genética em begomovírus brasileiros (Galvão
443 et al., 2003; Inoue-Nagata et al., 2006; Ribeiro et al., 2007) e no mundo (Garcia-
444 Andres et al., 2007a; Garcia-Andres et al., 2006; Garcia-Andres et al., 2007b; Monci et
445 al., 2002b; Pita et al., 2001). Eventos de recombinação detectados neste trabalho
446 mostram que vírus de plantas daninhas (*Sida micrantha mosaic virus*, SimMV) estão
447 recombinando com vírus descritos em tomate (*Tomato yellow vein streak virus*,
448 ToYVSV) dando lugar a isolados mais adaptados como o ToSRV. A combinação de

449 isolados presentes em plantas daninhas e cultivadas podem estar gerando também
450 novos isolados mais agressivos, como por exemplo, o *Tomato yellow spot virus*
451 (ToYSV) ainda pouco disseminado no Brasil. Apesar de ter sido isolado de
452 tomateiro, suas características moleculares e filogenéticas são mais semelhantes às
453 de begomovírus isolados de *Sida* sp., como o *Sida mottle virus* (SiMoV), *Sida yellow*
454 *mosaic virus* (SiYMV) e *Sida micrantha mosaic virus* (SimMV) (Andrade et al.,
455 2006).

456 A ampla distribuição do ToSRV em Viçosa indica que este vírus tem
457 conseguido adaptar-se a região e junto com ele as medidas de controle poderão ser
458 mais específicas no controle principalmente do vetor, no controle das plantas
459 daninhas que por ventura manifestem sintomas próximo das lavouras e que venham a
460 constituir possíveis fontes de inóculo para as novas lavouras e a introdução de
461 variedades resistentes portadoras de novos genes ou combinações de genes que
462 permitam manter esta doença abaixo do nível de dano para a cultura.

463

464 **AGRADECIMENTOS**

465 Os autores agradecem à FAPEMIG pela concessão de bolsa de pesquisa ao
466 primeiro autor do trabalho e à CAPES, pelo financiamento do projeto de cooperação
467 bilateral internacional CAPES-MES 067/09.

468

469 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

470 Andrade EC, Manhani GG, Alfenas PF, Calegario RF, Fontes EPB, Zerbini FM
471 (2006) *Tomato yellow spot virus*, a tomato-infecting begomovirus from Brazil
472 with a closer relationship to viruses from *Sida* sp., forms pseudorecombinants
473 with begomoviruses from tomato but not from *Sida*. *Journal of General Virology*
474 87: 3687-3696.

475 Barbosa JC, Barreto SS, Inoue-Nagata AK, Rezende JAM (2011) Characterization
476 and experimental host range of a Brazilian tomato isolate of *Tomato severe*
477 *rugose virus*. *Journal Phytopathol* 159: 644–646.

478 Bedford ID, Briddon RW, Brown JK, Rosell RC, Markham PG (1994) Geminivirus
479 transmission and biological characterisation of *Bemisia tabaci* (Gennadius)
480 biotypes from different geographic regions. *Annals of Applied Biology* 125:
481 311-325.

482 Castillo-Urquiza GP (2008) Diversidade e estrutura genética de begomovírus em

483 duas regiões produtoras de tomate do Sudeste do Brasil. In: Fitopatologia.
 484 Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, p 107.

485 Castillo-Urquiza GP, Beserra Jr. JEA, Bruckner FP, Lima ATM, Varsani A, Alfenas-
 486 Zerbini P, Zerbini FM (2008) Six novel begomoviruses infecting tomato and
 487 associated weeds in Southeastern Brazil. Arch Virol 153: 1985–1989.

488 Colariccio A, Bergmann JC, Eiras M, Chaves ALR, Chagas CM, Zerbini FM (2006)
 489 *Tomato rugose mosaic virus* in Tomato Crops in São Paulo State, Brazil.
 490 Fitopatologia Brasileira 31: 4036.

491 Costa AS (1975) Increase in the populational density of *Bemisia tabaci*, a threat to
 492 widespread virus infection of legume crops in Brazil. In: Bird J, Maramorosch K
 493 (eds) Tropical Diseases of Legumes. Academic Press, New York, p 171.

494 Cotrim MAA, Krause-Sakate R, Narita N, Zerbini FM, Pavan MA (2007a)
 495 Diversidade genética de begomovírus em cultivos de tomateiro no Centro-Oeste
 496 Paulista. Summa Phytopathologica 33: 300-303.

497 Della-Vecchia MGS, Rosa DD, Bergamin Filho A, Amorim L, Rezende JAM,
 498 Ribeiro A (2007) Dinâmica temporal e espacial da begomovirose causada por
 499 *Tomato yellow vein streak virus* em tomateiro na região de Campinas-SP.
 500 Summa Phytopathologica 33: 388-396.

501 Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: Version II.
 502 Plant Molecular Biology Reporter 1: 19-21.

503 Edgar RC (2004) MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced
 504 time and space complexity. BMC Bioinformatics 5: 1-19.

505 Fauquet CM, Briddon RW, Brown JK, Moriones E, Stanley J, Zerbini FM, Zhou X
 506 (2008) Geminivirus strain demarcation and nomenclature. Archives of Virology
 507 153: 783-821.

508 Fernandes FR, Albuquerque LCD, Giordano LDB, Boiteux LS, Avila ACD, Inoue-
 509 Nagata AK (2008) Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus
 510 species associated to tomatoes. Virus Genes 36: 251–258.

511 Font MI, Rubio L, Martinez-Culebras PV, Jorda C (2007) Genetic structure and
 512 evolution of natural populations of viruses causing the *Tomato yellow leaf curl*
 513 disease in Spain. Virus Research 128: 43-51.

514 Fu YLi WH (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. Genetics 133: 693-709.

515 Galvão RM, Mariano AC, Luz DF, Alfenas PF, Andrade EC, Zerbini FM, Almeida

MR, Fontes EPB (2003) A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. *Journal of General Virology* 84: 715-726.

Garcia-Andres S, Accotto GP, Navas-Castillo J, Moriones E (2007a) Founder effect, plant host, and recombination shape the emergent population of begomoviruses that cause the *Tomato yellow leaf curl* disease in the Mediterranean basin. *Virology* 359: 302-312.

Garcia-Andres S, Monci F, Navas-Castillo J, Moriones E (2006) Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. *Virology* 350: 433-442.

Garcia-Andres S, Tomas DM, Sanchez-Campos S, Navas-Castillo J, Moriones E (2007b) Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of *Tomato yellow leaf curl* disease-associated begomoviruses. *Virology* 365: 210-219.

García-Arenal F, Fraile A, Malpica JM (2001) Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Reviews Phytopathologic* 39: 157-186.

Ge L, Zhang J, Zhou X, Li H (2007) Genetic structure and population variability of *Tomato yellow leaf curl China virus*. *Journal of Virology* 81: 5902-5907.

Huson DH, Bryant D (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution* 23: 254-267.

Inoue-Nagata AK, Albuquerque LC, Rocha WB, Nagata T (2004) A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi 29 DNA polymerase. *Journal of Virological Methods* 116: 209-211.

Inoue-Nagata AK, Martin DP, Boiteux LS, Giordano LD, Bezerra IC, de Avila AC (2006) New species emergence via recombination among isolates of the Brazilian tomato infecting Begomovirus complex. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 41: 1329-1332.

Lazarowitz SG (1992) Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences* 11: 327-349.

Lefeuvre P, Lett JM, Reynaud B, Martin DP (2007a) Avoidance of protein fold disruption in natural virus recombinants. *PLoS Pathogens* 3: e181.

Lefeuvre P, Martin DP, Hoareau M, Naze F, Delatte H, Thierry M, Varsani A, Becker N, Reynaud B, Lett JM (2007b) Begomovirus 'melting pot' in the south-west Indian Ocean islands: Molecular diversity and evolution through recombination.

549 Journal of General Virology 88: 3458-3468.

550 Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA
551 polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.

552 Lima MF, Bezerra IC, Ribeiro SG, Ávila AC (2001) Distribuição de geminivírus nas
553 culturas do tomate e pimentão em doze municípios do Submédio do Vale do São
554 Francisco. *Fitopatologia Brasileira* 26: 81-85.

555 Lourenção AL, Nagai H (1994) Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de
556 São Paulo. *Bragantia* 53: 53-59.

557 Mansoor S, Briddon RW, Zafar Y, Stanley J (2003) Geminivirus disease complexes:
558 An emerging threat. *Trends in Plant Science* 8: 128-134.

559 Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P (2010) RDP3: A
560 flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics*
561 26: 2462-2463.

562 Monci F, Sanchez-Campos S, Navas-Castillo J, Moriones E (2002) A natural
563 recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*
564 and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is
565 becoming prevalent in Spanish populations. *Virology* 303: 317-326.

566 Morales FJ, Jones PG (2004) The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted
567 viruses in Latin America. *Virus Research* 100: 57-65.

568 Naranjo SE, Ellsworth PC (2001) Challenges and opportunities for pest management
569 of *Bemisia tabaci* in the new century. *Crop Protection* 20: 707.

570 Nozaki DN, Krause-Sakate R, Hasegawa JM, Cesar MA, Dziuba PH, Pavan MA
571 (2005) Ocorrência de *Tomato severe rugose virus* em pimentão (*Capsicum*
572 *annuum* L.) no estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 30 (Suplemento):
573 S189.

574 Pita JS, Fondong VN, Sangare A, Otim-Nape GW, Ogwal S, Fauquet CM (2001)
575 Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are
576 determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda.
577 *Journal of General Virology* 82: 655-665.

578 Prasanna HC, Sinha DP, Verma A, Singh M, Singh B, Rai M, Martin DP (2010) The
579 population genomics of begomoviruses: global scale population structure and
580 gene flow. *Virology Journal* 7: 1-12.

581 Ramos-Sobrinho R, Silva SJC, Silva TAL, Ribeiro SG, Lima GSA, Assunção IP,

582 Zerbini FM (2010) Genetic structure of a population of the begomovirus *Bean*
583 *golden mosaic virus* (BGMV) that infects lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in
584 the state of Alagoas, Brazil. In: 6th International Geminivirus Symposium and
585 4th International ssDNA Comparative Virology Workshop, Guadalajara, México

586 Ribeiro SG, Martin DP, Lacorte C, Simões IC, Orlandini DRS, Inoue-Nagata AK
587 (2007) Molecular and biological characterization of *Tomato chlorotic mottle*
588 *virus* suggests that recombination underlies the evolution and diversity of
589 Brazilian tomato begomoviruses. *Phytopathology* 97: 702-711.

590 Rocha CS (2011) Variabilidade e estrutura genética de populações de begomovírus
591 em tomateiro e plantas daninhas em seis localidades do sudeste brasileiro. In:
592 Dep de Genética e Melhoramento. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG,
593 p 129.

594 Rojas A, Kvarnheden A, Marcenaro D, Valkonen JPT (2005) Sequence
595 characterization of *Tomato leaf curl Sinaloa virus* and *Tomato severe leaf curl*
596 *virus*: Phylogeny of New World begomoviruses and detection of recombination.
597 *Archives of Virology* 150: 1281-1299.

598 Seal SE, VandenBosch F, Jeger MJ (2006) Factors influencing begomovirus
599 evolution and their increasing global significance: Implications for sustainable
600 control. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25: 23-46.

601 Souza-Dias JAC, Sawazaki HE, Pernambuco-Fo PCA, Elias LM, Maluf H (2008)
602 *Tomato severe rugose virus*: Another Begomovirus Causing Leaf Deformation
603 and Mosaic Symptoms on Potato in Brazil. *Plant Disease* 92: 487.

604 Stanley J, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Fauquet CM, Harrison BD, Rybicki
605 EP, Stenger DC (2005) Family Geminiviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA,
606 Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds) *Virus Taxonomy Eighth Report of the*
607 *International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San
608 Diego, pp 301-326

609 Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by
610 DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.

611 Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular evolutionary
612 genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and*
613 *Evolution* 24: 1596–1599.

614 Villas-Bôas GL, França FH, Macedo N (2002) Potencial biótico da mosca-branca

615 Bemisia argentifolii a diferentes plantas hospedeiras. Horticultura Brasileira 20:
616 71-79.

617 Wright S (1951) The genetical structure of populations. Ann Eugenics 15: 323-354.

618 Xavier CAD, Aguilera JG, Laurindo BS, Freitas RD, Soares MO, Silva DJH, Zerbini
619 FM (2011) Avaliação de subamostras de tomate para resistência a geminivirus
620 em condições de campo com infecção natural. In: ABH (ed) 51o Congresso
621 Brasileiro de Olericultura, Viçosa, pp 3325-3333.

622 Zerbini FM (2006) Manejo de viroses: um desafio para o produtor e para o
623 pesquisador. In: Brasileira F (ed) 39º Congresso Brasileiro de Fitopatologia,
624 Salvador, BA, pp S11-S13.